



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ**

**Διερεύνηση μετα-μεταγραφικών μηχανισμών που εμπλέκονται  
στις παθοφυσιολογικές διεργασίες του νευρικού συστήματος με  
έμφαση στον νευροεκφυλισμό**

**Διδακτορική Διατριβή  
Φαίδων Γιασίν Καττάν**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ  
2023**



### **Επιβλέπουσα Καθηγήτρια**

Τράγκα Θεώνη Ομότιμη Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα ΒΕΤ,  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

### **Επιβλέπων Ερευνητής**

Δοξάκης Επαμεινώνδας Ερευνητής Γ', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της  
Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Τράγκα Θεώνη Ομότιμη Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα ΒΕΤ,  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Πρόεδρος επιτροπής)

Μιχαηλίδης Θεολόγος Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής, Τμήμα  
ΒΕΤ, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ζαγοραίου Λασκαρώ Ερευνητής Γ', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της  
Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

### **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Δοξάκης Επαμεινώνδας Ερευνητής Γ', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της  
Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

Δουρής Βασίλειος Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα ΒΕΤ,  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ζαγοραίου Λασκαρώ Ερευνητής Γ', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της  
Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

Μιχαηλίδης Θεολόγος Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής, Τμήμα  
ΒΕΤ, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Παληκαράς Κωνσταντίνος Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Τράγκα Θεώνη Ομότιμη Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα ΒΕΤ,  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Φίλιου Μιχαέλα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα ΒΕΤ,  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

στο θείο μου Θεοφάνη

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιστημονικό μου υπεύθυνο Δρ. Επαμεινώνδα Δοξάκη για τη δυνατότητα που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της επιστημονικής του ομάδας, αλλά κυρίως για την καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη και τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου την Δρ. Θεώνη Τράγκα, τον Δρ. Θεολόγο Μιχαηλίδη και την Δρ. Λασκαρώ Ζαγοραίου για την ετοιμότητα και προθυμία να βοηθήσουν όλα αυτά τα χρόνια, ακόμα και εν μέσω πανδημίας αλλά και για την τιμή που μου έκαναν συμμετέχοντας στην τριμελή επιτροπή.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Δρ. Μιχαέλα Φίλιου, τον Δρ. Βασίλειο Δουρή και τον Δρ. Κωνσταντίνο Παληκαρά που με τίμησαν με τη συμμετοχή τους στην επταμελή επιτροπή.

Ακόμα, ευχαριστώ ιδιαίτερα τα μέλη του εργαστηρίου Μαριάννα Νάκη, Στέλιο Ραβανίδη, Όλγα Γουρδομιχάλη και Πελαγία Κουκουράκη αλλά και όλα τα υπόλοιπα νυν και πρώην μέλη για την επιστημονική υποστήριξη που πρόσφεραν απλόχερα και την εξαιρετική επαγγελματική και φιλική συνύπαρξη που είχαμε τόσα χρόνια.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω από την καρδιά μου τους φίλους και την οικογένειά μου η υποστήριξη και συμπαράσταση των οποίων ήταν θεμελιώδης για την ολοκλήρωση της εργασίας.

# ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ

**ACTB:** βήτα ακτίνη (actin beta)

**AD:** νόσος Αλτσχάιμερ (Alzheimer's disease)

**ALS:** αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (amyotrophic lateral sclerosis)

**ARE:** Στοιχεία πλούσια σε βάσεις αδενίνης και ουρακίλης (AU-rich Elements)

**ATP:** Τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate)

**AUF1:** παράγοντας πρόσδεσης σε περιοχές πλούσιες σε Αδενίνη και Ουρακίλη (A+URich Element Binding Factor 1)

**BAN:** 1-βρωμο, 4-μεθυλο βενζόλιο (4-bromoanisole)

**cDNA:** συμπληρωματικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (complementary deoxyribonucleic acid)

**CDS:** κωδικοποιούσα περιοχή (coding sequence)

**CTP:** Τριφωσφορική κυτοσίνη (Cytidine triphosphate)

**CFIm:** παράγοντας διάσπασης I (Cleavage factor Im)

**CFIIIm:** παράγοντας διάσπασης I (Cleavage factor IIm)

**CNOT1:** υπομονάδα συμπλόκου μεταγραφής CCR4-NOT 1 (CCR4-NOT transcription complex subunit 1)

**CPSF:** παράγοντας εξειδίκευσης της διάσπασης και πολυαδενυλίωσης (Cleavage and polyadenylation specificity factor)

**CSTF:** παράγοντας διέγερσης της διάσπασης (Cleavage stimulation factor)

**DAPI:** 4',6-διαμιδινο-2-φαινυλ-ινδόλη (4',6-diamidino-2-phenylindole)

**DLB:** Άνοια με σωμάτια Lewy (Dementia with Lewy bodies)

**DMEM:** τροποποιημένο θρεπτικό υλικό Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium)

**DMSO:** διμεθυλο-σουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide)

**DNA:** δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (deoxyribonucleic acid)

**dNTPs:** Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (Deoxynucleoside Triphosphates)

**DRB:** 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosyl-1H-benzimidazole

**DTT:** διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol)

**ECL:** ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (enhanced chemiluminescence)

**EDTA:** αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (ethylene diamine tetra-acetic acid)

**GFP:** πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein)

**FBS:** Ορός εμβρύου μόσχου (Fetal Bovine Serum)

**GAPDH:** αφυδρογονάση της φωσφορικής γλυκεραλδεΰδης (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)

**GTP:** Τριφωσφορική γουανοσίνη (guanosine triphosphate)

**HEK:** εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού (Human embryonic kidney)

**HEPES:** υδροξυ-αιθυλ-πιπεραζιν-αιθαν-σουλφονικό οξύ (4-(2-hydroxyethyl)-1-



piperazineethanesulfonic acid)

**hnRNPA1:** ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη A1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1)

**HLB:** υπότονο διάλυμα λύσης (Hypotonic lysis buffer)

**HRP:** υπεροξειδάση χρένου (horseradish peroxidase)

**IgG:** ανοσοσφαιρίνη G (immunoglobulin G)

**IP:** ανοσοκατακρήμιση (immunoprecipitation)

**IRES:** Εσωτερικές θέσεις πρόσδεσης ριβοσώματος (Internal Ribosome Entry Sites)

**LB:** σωματία Lewy (Lewy bodies)

**MMLV RT:** αντίστροφη μεταγραφάση του λευχαιμογόνου ιού του Moloney (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)

**mg:** milligram (χιλιοστόγραμμα)

**ml:** milliliter (χιλιοστόλιτρο)

**mM:** milliMolar (χιλιοστομοριακότητα)

**mRNA:** αγγελιαφόρο RNA (messenger RNA)

**MSA:** ατροφία πολλαπλών συστημάτων (Multiple System Atrophy)

**NP-40:** νονυλ-φαινοξυπολυαιθοξυλαιθανόλη-40 (nonyl phenoxypolyethoxyethanol-40)

**PABPC1:** κυτταροπλασματική πρωτεΐνη πρόσδεσης πολύ(A) (poly(A) binding protein cytoplasmic 1)

**PAS:** σήμα πολυαδενυλίωσης (polyadenylation signal)

**PBS:** διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffered saline)

**PCR:** αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction)

**PD:** νόσος του Πάρκινσον (Parkinson's disease)

**PLB:** διάλυμα λύσης πολυσωμάτων (Polysome Lysis Buffer)

**PFA:** παραφολμαδεΰδη (paraformaldehyde)

**qPCR:** Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative PCR)

**RBP:** πρωτεΐνες πρόσδεσης σε RNA (RNA Binding proteins)

**RIP:** Ανοσοκατακρήμιση Ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων (Ribonucleoprotein Immunoprecipitation)

**RH:** Τυχαία εξαμερή (Random Hexamers)

**RNA:** ριβονουκλεϊκό οξύ (ribonucleic acid)

**RRM:** Μοτίβο Αναγνώρισης RNA (RNA Recognition Motif)

**RT:** Θερμοκρασία δωματίου (Room Temperature)

**RT-PCR:** αντίστροφης μεταγραφής αντίδραση πολυμεράσης (reverse transcriptionPCR)

**SYBR Green:** (N', N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine)

**SDS:** δωδεκυλο-θειικό νάτριο (sodium dodecyl-sulphate)

**SDS-PAGE:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, παρουσία SDS (SDSpolyacrylamide gel electrophoresis)

**SNCA:** α-συνουκλεΐνη

**SNPs:** γονιδιακοί πολυμορφισμοί (Single-nucleotide polymorphism)

**TBS:** αλατούχο διάλυμα ρυθμιζόμενο με Tris (Tris-buffered saline)

**TEMED:** τετραμεθυλ-μεθυλ-αιθυλενο-διαμίνη (tetramethyl-ethylene-diamine)

**Tris:** τρις (υδροξύμεθυλο) αμινομεθάνιο (tris(hydroxymethyl)aminomethane)

**Triton X-100:** πολυοξαιθυλεν-οκτυλο-φαινυλαιθέρας (polyoxyethylene-octyl-phenylether)

**TTP:** Τριφωσφορική θυμίνη (Thymidine triphosphate)

**U1snRNP:** μικρή πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη U1 (small nuclear ribonucleoprotein U1)

**UTR:** αμετάφραστη περιοχή (Untranslated region)

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## Περιεχόμενα

Εισαγωγή .....	8
1. Η νόσος του Πάρκινσον .....	8
1.1 Παθολογικά χαρακτηριστικά.....	8
1.2 Μηχανισμοί νευροεκφυλισμού .....	9
2. Η πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη .....	10
2.1 Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης.....	10
2.2 Η πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη .....	11
2.3 Παθολογία και συσχέτιση της α-συνουκλεΐνης με τη νόσο Πάρκινσον .....	12
3. Ρυθμική του mRNA μέσα από το 3'UTR .....	14
3.1 Εναλλακτική πολυαδενυλίωση .....	14
3.2 Κύριοι παράγοντες επεξεργασίας του 3' άκρου του προ-mRNA.....	15
4. Οι πρωτεΐνες δέσμησης RNA.....	16
5. Η πρωτεΐνη AUF1.....	17
5.1 Το γονίδιο και η δομή της AUF1.....	17
5.2 Μηχανισμός δράσης της AUF1.....	17
5.3 Συσχέτιση της AUF1 με παθολογία .....	18
6. hnRNP1.....	18
6.1 Το γονίδιο και η δομή της hnRNP1 .....	18
6.2 Μηχανισμός δράσης της hnRNP1 .....	19
6.3 Φυσιολογική και παθολογική δράση της hnRNP1 .....	20
Σκοπός της μελέτης .....	22
Υλικά .....	24
Κυτταρικά συστήματα .....	24
Φορείς κλωνοποίησης.....	24
Λοιποί πλασμιακοί φορείς.....	25
Φαρμακολογικοί αναστολείς .....	25
Χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την καλλιέργεια των κυττάρων, τη διαμόλυση και την επιμόλυση .....	25
Διαλύματα-Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο ανοσοσύστημα κατά Western.....	25
Αντισώματα για ανοσοσύστημα κατά Western .....	26
Διαλύματα – Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών .....	27
Διαλύματα - Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης RNA .....	27

Διαλύματα-Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην απομόνωση RNA, στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), στην αντίδραση <i>in vitro</i> μεταγραφής και στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR).....	27
Διαλύματα - Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ενεργότητας πρωτεασώματος.....	28
Διαλύματα-Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην <i>in situ</i> υβριδοποίηση.....	28
Μέθοδοι.....	29
Δημιουργία κατασκευών DNA.....	29
Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών.....	29
Διαμόλυνση κυττάρων.....	29
Απομόνωση RNA.....	29
Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	30
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο -Ποσοτική PCR (qPCR-Real time PCR).....	30
Δοκιμασία ακτινομυκίνης D.....	30
Δοκιμασία extension poly(A) test (ePAT).....	30
Απομόνωση πρωτεϊνών.....	31
Ανοσοστύπωμα κατά Western.....	31
Ανοσοκατακρήμνιση RNA.....	32
Έλεγχος συγγένειας ριβοσώματος με το mRNA.....	32
Συν-ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών.....	32
Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με βιοτινυλιωμένο RNA.....	33
Κυτταρική κλασματοποίηση.....	33
In situ υβριδοποίηση RNA ταυτόχρονα με ανοσοκυτταροχημεία.....	33
Δοκιμασία πουρομυκίνης (SUNSET).....	34
Δοκιμασία DRB.....	34
Ανάλυση αναστολής πρωτεασώματος.....	34
Προσδιορισμός της ενεργότητας του πρωτεασώματος.....	35
Πλασμιδιακά συστήματα ελέγχου αυτοφαγικής ροής.....	35
Στατιστική επεξεργασία.....	36
1. AUF1.....	38
1.1 Η AUF1 προσδέεται στο 3' αμετάφραστο άκρο του mRNA της α-συνουκλεΐνης.....	38
1.2 Η υπερέκφραση AUF1 μειώνει τα επίπεδα mRNA συνουκλεΐνης.....	39
1.3 Η AUF1 επηρεάζει την σταθερότητα του mRNA της α-συνουκλεΐνης.....	41
1.4 Η AUF1 επηρεάζει το μήκος της πολύ(A) ουράς του mRNA της α-συνουκλεΐνης.....	42
1.5 Η AUF1 στρατολογεί την πρωτεΐνη συναρμογής CNOT1 στο mRNA της α-συνουκλεΐνης.....	43

1.6 Η AUF1 στρατολογεί την εξωνουκλεάση CNOT7 στη CNOT1 .....	44
1.7 Μεταβολή στα επίπεδα της AUF1 οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της ενδογενούς α- συνουκλεΐνης.....	45
1.8 Η AUF1 μειώνει την συγγένεια του ριβοσώματος με το mRNA της α-συνουκλεΐνης .....	46
1.9 Η AUF1 δρα ανεξάρτητα των miRNA-7 & miRNA-153 στο mRNA της α-συνουκλεΐνης.....	47
1.10 Η AUF1 δρα ανεξάρτητα των miRNA-7 & miRNA-153 στα πρωτεϊνικά επίπεδα της α- συνουκλεΐνης.....	48
1.11 Η AUF1 επηρεάζει την ωρίμανση του προ-mRNA της α-συνουκλεΐνης .....	49
1.12 Η απουσία AUF1 αποτρέπει την έξοδο του mRNA της α-συνουκλεΐνης από τον πυρήνα .....	50
2. hnRNP1.....	51
2.1 Η hnRNP1 προσδένεται στο RNA της α-συνουκλεΐνης .....	51
2.2 Η hnRNP1 ενισχύει την μεταγραφή της α-συνουκλεΐνης.....	52
2.3 Η hnRNP1 επηρεάζει διαφορετικά την έξοδο των ισομορφών mRNA της α-συνουκλεΐνης από τον πυρήνα.....	53
2.4 Η hnRNP1 μειώνει την αξονική παρουσία του mRNA της α-συνουκλεΐνης και πρωτεΐνης .....	54
2.5 Η hnRNP1 επηρεάζει τον σχηματισμό των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών κοκκίων της α- συνουκλεΐνης.....	55
2.6 Διακύμανση στα επίπεδα hnRNP1 διαταράσσει τις ποσότητες των ενδογενών μεταγράφων της α-συνουκλεΐνης .....	56
2.7 Η hnRNP1 δεν παρεμβαίνει άμεσα στον μηχανισμό εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης .	57
2.8 Η hnRNP1 δεν συνεργάζεται με την U1snRNP προς επαγωγή εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης.....	59
2.9 Η hnRNP1 επιταχύνει την RNA πολυμεράση II .....	60
2.10 Η hnRNP1 αποσταθεροποιεί το mRNA της α-συνουκλεΐνης.....	61
2.11 Η hnRNP1 επάγει από-αδενυλίωση του mRNA της α-συνουκλεΐνης.....	63
2.12 Η hnRNP1 δεν ελέγχει το mRNA της α-συνουκλεΐνης μέσω miRNA .....	64
2.13 Η hnRNP1 μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα α-συνουκλεΐνης.....	65
2.14 Η hnRNP1 δεν επηρεάζει τη συγγένεια mRNA της α-συνουκλεΐνης – ριβοσώματος ...	66
2.15 Η hnRNP1 επιδρά θετικά στην δραστηριότητα του πρωτεασώματος .....	67
2.16 Η hnRNP1 επάγει τον καταβολισμό των ουβικουτινιωμένων πρωτεϊνών .....	68
2.17 Η hnRNP1 δεν αλλάζει τα επίπεδα πρωτεϊνών της αυτοφαγίας.....	69
2.18 Η hnRNP1 εμπλέκεται στην αυτοφαγική ροή.....	70
Συζήτηση .....	74
Βιβλιογραφία.....	80
Περίληψη.....	96

Abstract .....	99
Παράρτημα.....	102





# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Εισαγωγή

### 1. Η νόσος του Πάρκινσον

Η νόσος του Πάρκινσον (νΠ), η οποία περιγράφηκε από τον James Parkinson το 1817<sup>1</sup>, είναι μια ανίατη χρόνια νευροεκφυλιστική νόσος, δεύτερη σε συχνότητα εμφάνισης μετά τη νόσο Αλτσχάιμερ (νΑ) η οποία επηρεάζει το 1% των ατόμων άνω των 60 ετών<sup>2</sup>, ποσοστό που ανεβαίνει στο 4% σε άτομα άνω των 80 ετών<sup>3</sup>. Η ασθένεια εμφανίζεται συχνότερα σε άνδρες, με αναλογία κυμαινόμενη από 1.3 έως 2.0<sup>4</sup>.

Η νόσος θεωρούνταν αρχικά ως αμιγώς κινητική διαταραχή με τρία βασικά σημεία: τρόμο ηρεμίας, δυσκαμψία και βραδυκινησία. Πρόσφατα αναθεωρήθηκαν τα κλινικά διαγνωστικά κριτήρια<sup>5</sup>. Η βραδυκινησία, η δυσκαμψία και ο τρόμος ηρεμίας εξακολουθούν να επισημαίνονται ως βασικά διαγνωστικά σημεία της νόσου. Το υποχρεωτικό σύμπτωμα της βραδυκινησίας πρέπει να εμφανίζεται σε συνδυασμό με τρόμο ηρεμίας, δυσκαμψία ή και τα δύο. Ωστόσο, οι αλλαγές στη στάση, και ιδίως η αστάθεια της στάσης, παραλείπονται. Τα νέα διαγνωστικά κριτήρια ορίζουν υποστηρικτικά κριτήρια, κριτήρια απόλυτου αποκλεισμού και κριτήρια 'κόκκινες σημαίες'. Για τη διάγνωση της "κλινικά τεκμηριωμένης νόσου Πάρκινσον" απαιτούνται τουλάχιστον δύο υποστηρικτικά κριτήρια, απουσία απόλυτων κριτηρίων αποκλεισμού και όχι κόκκινες σημαίες<sup>6</sup>.

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί προσοχή στα πρόδρομα μη κινητικά συμπτώματα της νόσου. Η δυσκοιλιότητα<sup>7</sup>, η υποσμία<sup>8</sup> και η διαταραχή του ύπνου REM<sup>9</sup> συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Η προκινητική φάση μπορεί να είναι παρατεταμένη, για παράδειγμα ο μέσος λανθάνων χρόνος μεταξύ της έναρξης της διαταραχής ύπνου REM και της εμφάνισης των παρκινσονικών κινητικών συμπτωμάτων είναι 12-14 έτη.

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί θεραπεία για τη νόσο, ωστόσο έχουν αναπτυχθεί ουσίες και τεχνικές οι οποίες επιτυγχάνουν την άμβλυση των συμπτωμάτων. Πρακτικά όλοι οι παρκινσονικοί ασθενείς θα λάβουν λεβοντόπα (L-DOPA) για ένα διάστημα. Η λεβοντόπα είναι πρόδρομη της ντοπαμίνης με την ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να μετατρέπεται σε ντοπαμίνη από το ένζυμο L-αμινοξική καρβοξυλάση. Συχνά χορηγείται ταυτόχρονα με καρβιντόπα (carbidopa) η οποία αποτρέπει τον μεταβολισμό της λεβοντόπα εκτός εγκεφάλου, αυξάνοντας έτσι την βιοδιαθεσιμότητα στο κεντρικό νευρικό σύστημα και μειώνοντας συμπτώματα όπως η ναυτία. Αγωνιστές της ντοπαμίνης διεγείρουν τους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς μειώνοντας την ένταση των συμπτωμάτων, όμως δεν είναι τόσο ισχυρά όσο η λεβοντόπα. Αναστολείς ενζύμων τα οποία εμπλέκονται στην διάσπαση της λεβοντόπα και της ντοπαμίνης (κατεχολ-Ο-μεθυλο τρανσφεράση και μονοαμινοξειδάση Β), παρατείνουν τη δράση των λεβοντόπα και καρβιντόπα. Σε περιπτώσεις που η απόκριση στη λεβοντόπα παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις συναρτήσει του χρόνου η βαθιά εγκεφαλική διέγερση του υποθαλαμικού πυρήνα και της χωράς σφαίρας έχει δειχθεί να βελτιώνει την κινητική συμπτωματολογία<sup>10</sup>.

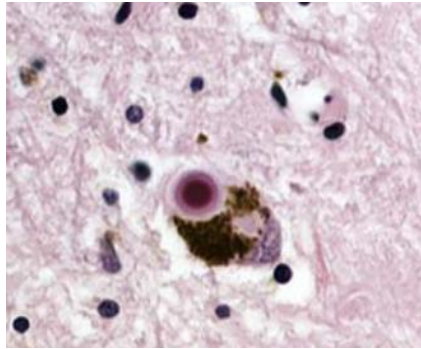
#### 1.1 Παθολογικά χαρακτηριστικά

Χαρακτηριστικό της νόσου του Πάρκινσον αποτελεί η απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων κυρίως στην συμπαγή μούρα της μέλανας ουσίας (substantia nigra pars compacta, SNpc), νευρώνων οι

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

οποίοι προβάλουν στο ραχιαίο κέλυφος του ραβδωτού. Υποστηρίζεται πως τα κινητικά συμπτώματα της νόσου οφείλονται στην απώλεια των νευρώνων αυτών<sup>11</sup>.

Κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό αναγνωρίζεται η παρουσία κυτταροπλασματικών εγκλείστων στους εναπομείναντες ντοπαμινεργικούς νευρώνες επονομαζόμενα σωματία Lewy (Lewy bodies, LB, Εικόνα 1) τα οποία περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων πρωτεϊνών μη διαλυτά συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης<sup>12,13</sup>. Τα σωματία Lewy εμφανίζονται και σε άλλες δομές του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος όπως ο οσφρητικός βολβός, η αμυγδαλή, το εντερικό νευρικό και το ισχιακό νεύρο<sup>14</sup>.



**Εικόνα 1.** Ανοσοϊστοχημεία ανθρώπινου εγκεφάλου post mortem με εμφανή τα σωματία Lewy<sup>15</sup>.

### 1.2 Μηχανισμοί νευροεκφυλισμού

Το επίπεδο στο οποίο η κληρονομικότητα επηρεάζει την επιρρέπεια στην ανάπτυξη νόσου του Πάρκινσον δεν έχει αποσαφηνισθεί, αλλά τις τελευταίες δυο δεκαετίες υπάρχει σημαντική πρόοδος στην διερεύνηση της μεντελικής συνισταμένης της νόσου. Συγγενείς πρώτου βαθμού παρκινσονικών ασθενών παρουσιάζουν 2-3 φορές υψηλότερη πιθανότητα να ασθενήσουν οι ίδιοι<sup>16,17</sup>. Σήμερα θεωρείται πως η γενετική παίζει ρόλο περίπου στο 5% των περιπτώσεων και προτείνεται πως μονογονιδιακές μορφές της νόσου αποτελούν το 5-10% των περιστατικών<sup>18</sup>. Επικρατής τύπος κληρονομικότητας έχει εντοπιστεί στα γονίδια SNCA, LRRK2, VPS35, EIF4G1, DNAJC13, και CHCHD2 και υπολειπόμενος στα γονίδια Parkin, PINK1, και DJ-1. Οι πρωτεΐνες που προκύπτουν από τα αναφερθέντα γονίδια εμπλέκονται στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, το σύστημα ουβικουϊτίνης-πρωτεασώματος, την δυναμική και κινητικότητα κυστιδίων, το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσώματος και το οξειδωτικό στρές<sup>19</sup>.

Βλάβες στους μηχανισμούς πρωτεόστασης της α-συνουκλεΐνης και αποικοδόμησης της μέσω του συστήματος αυτοφαγίας-λυσώματος αποτελούν από τις πλέον μελετημένες οδούς μέσω των οποίων επάγεται παθολογία στη νόσο Πάρκινσον. Οφειλόμενες σε απώλεια ή δυσλειτουργία των πρωτεϊνών άμεσα εμπλεκόμενες στις διαδικασίες αλλά και έμμεσα μέσα από αλλοίωση της κυστιδικής διακίνησης, οι παραπάνω μεταβολές είναι ικανές να αφήσουν τα κύτταρα ευαίσθητα στα ινίδια α-συνουκλεΐνης<sup>20</sup> και ικανά να συνεισφέρουν στην περαιτέρω συσσώρευσή τους και διακυτταρική μετάδοσή τους<sup>21</sup>.

Δεδομένων των ιδιαίτερων μεταβολικών αναγκών τις οποίες παρουσιάζουν πολυμέτα κύτταρα όπως οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες<sup>22</sup> δεν ξαφνιάζει το γεγονός πως προβλήματα στην κυτταρική σηματοδότηση που διέπει τους μηχανισμούς μιτοχονδριακής βιογένεσης, της μετακίνησης, της

δυναμικής σύντηξης – διάσπασης μιτοχονδρίων, της μιτοφαγίας, αλλά και της ίδιας της αναπνευστικής αλυσίδας έχουν την ικανότητα να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο με επακόλουθο την επιδείνωση της παθολογίας<sup>23</sup>.

Πέρα από τους μηχανισμούς κυτταρικής βλάβης εντός των ντοπαμινεργικών νευρώνων, η φλεγμονή στο νευρικό σύστημα έχει αναγνωριστεί για τη συνεισφορά της στην παθολογία της νόσου του Πάρκινσον<sup>24</sup>. Αυξημένη σηματοδότηση από υπερ-ενεργοποιημένη μικρογλοία<sup>25</sup>, αστροκύτταρα σε 'A1' μοίρα και κυτταροτοξικά T κύτταρα<sup>26</sup> μπορούν να δράσουν ανεξάρτητα ή συνεργατικά για να μεσολαβήσουν στο θάνατο των ντοπαμινεργικών νευρώνων.

## 2. Η πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη

### 2.1 Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης

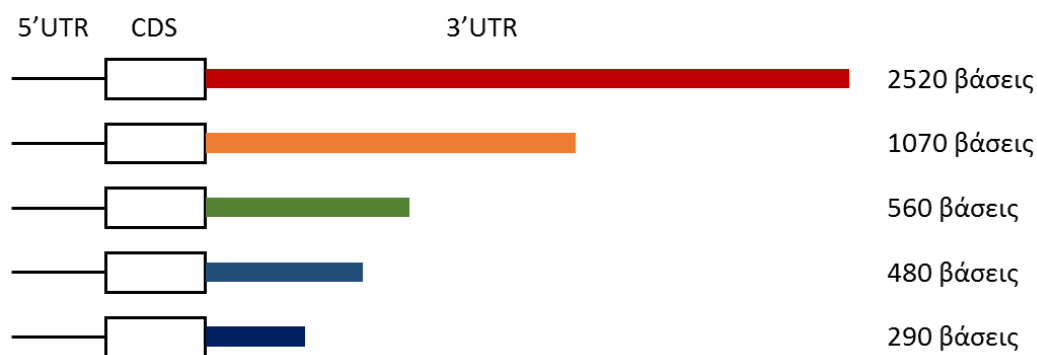
Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης εντοπίζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 4 (4q22.1) και αποτελείται από 6 εξόνια. Στον άνθρωπο, έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 4 διαφορετικά μετάγραφα (mRNA) τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές της α-συνουκλεΐνης (Εικόνα 2). Η μετάφραση όλων των εξονίων οδηγεί στην παραγωγή της πρωτεΐνης που αποτελείται από 140 αμινοξέα ενώ η απουσία των εξονίων 3, 5 ή και των δύο, οδηγούν στην παραγωγή των ισομορφών που αποτελούνται από 126, 112 και 98 αμινοξέα, αντίστοιχα<sup>27</sup>.



**Εικόνα 2.** Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης εδράζεται στο χρωμόσωμα 4, εναλλακτικό μάτισμα των 6 εξονίων της παράγει τέσσερεις διαφορετικές ισομορφές.

Το εξόνιο 6 περιλαμβάνει το 3' αμετάφραστο άκρο (3' untranslated region – 3'UTR) του γονιδίου το οποίο με τη σειρά του μέσα από το μηχανισμό της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης είναι ικανό να παράγει πολλά διαφορετικά μήκη στο τελικό μετάγραφο. Πιο συγκεκριμένα έχουν αναγνωριστεί 3'UTR με μήκη 290, 480, 560, 1070 και 2520 βάσεων (Εικόνα 3) σε διαφορετικές αναλογίες στους ασθενείς με Πάρκινσον σε σχέση με υγιή άτομα<sup>28</sup>. Επιπλέον το μήκος του 3'UTR του mRNA της α-συνουκλεΐνης βρέθηκε να επηρεάζει τα επίπεδα μετάφρασης σε in vitro μοντέλο<sup>29</sup>.

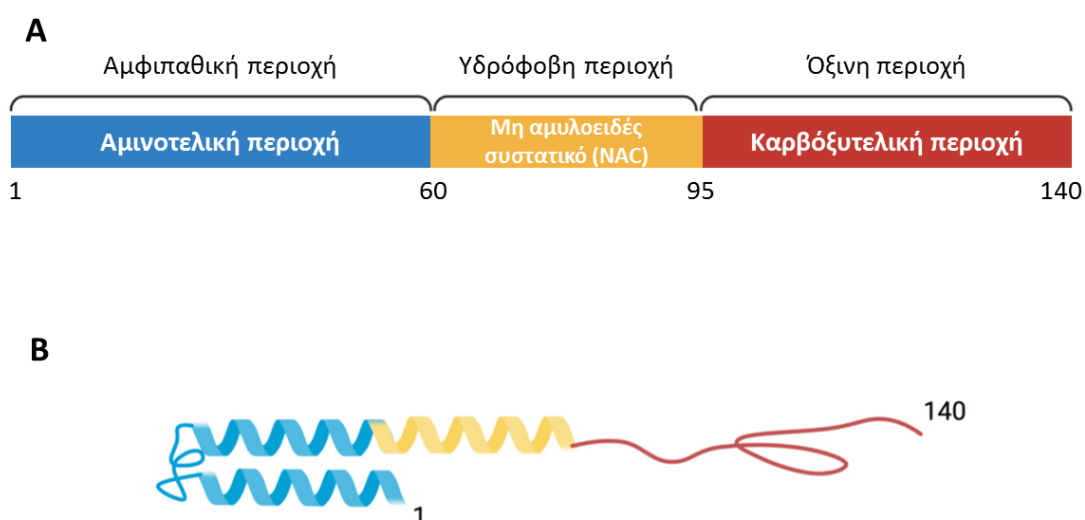
## ΕΙΣΑΓΩΓΗ



**Εικόνα 3.** Η διαδικασία της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης παράγει πέντε διαφορετικές ισομορφές του 3' αμετάφραστου άκρου της α-συνουκλεΐνης<sup>29</sup>.

### 2.2 Η πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη

Η α-συνουκλεΐνη αποτελείται από μια αμφίπαθη αμινοτελική περιοχή (1-60), το μη-αμυλοειδές συστατικό (NAC) (61-95) και μια όξινη καρβοξυτελική περιοχή (96- 140) (Εικόνα 4). Η αμινοτελική περιοχή της α-συνουκλεΐνης χαρακτηρίζεται από την παρουσία επτά εξαιρετικά συντηρημένων αλληλουχιών επανάληψης 11 αμινοξέων που σχηματίζουν μια αμφίπαθη α-έλικα η παρουσία της οποίας της επιτρέπει να συνδέεται με μεμβράνες<sup>30</sup>. Το μη αμυλοειδές συστατικό (NAC) έχει υδρόφοβο χαρακτήρα και είναι υπεύθυνο για τη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης<sup>31</sup>. Τέλος, η καρβοξυτελική περιοχή της α-συνουκλεΐνης, είναι πολική και αποτελείται από πολλά φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων. Μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης με άλλες πρωτεΐνες<sup>32</sup> και μεταλλικά ιόντα<sup>33</sup> και περιέχει τις περισσότερες θέσεις μετα-μεταφραστικής τροποποίησης<sup>34</sup>. Έχει αναφερθεί ότι η διαγραφή της C-τελικής περιοχής διευκολύνει τη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης και εξαλείφει τη δράση της ως συνοδός<sup>35</sup>.



**Εικόνα 4** Σχηματική απεικόνιση της πρωτοταγούς (A) και δευτεροταγούς (B) δομής της α-συνουκλεΐνης. Η πρωτεΐνη αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές, από μια αμφίπαθη αμινοτελική περιοχή (1-60), το μη-αμυλοειδές συστατικό (NAC) (61-95) και μια όξινη καρβοξυτελική περιοχή (96- 140)<sup>36</sup>.

Η α-Syn έχει συσχετιστεί κυρίως με το κεντρικό νευρικό σύστημα, αλλά έχει αναφερθεί η παρουσία της και σε μη νευρωνικούς ιστούς. Εντοπίζεται κυρίως στις προσυναπτικές απολήξεις των νευρώνων και θεωρείται σημαντική για τη συναπτική πλαστικότητα και την κυψελιδική συσκευασία και διακίνηση<sup>37,38</sup>. Η α-συνουκλεΐνη δεσμεύει λιπαρά οξέα και βοηθά στη μεταφορά τους από το κυτταρόπλασμα στις διάφορες κυτταρικές μεμβράνες<sup>39</sup>. Πιστεύεται ότι ρυθμίζει την ποσότητα των συναπτικών κυστιδίων που προσδένονται στη σύναψη κατά την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών<sup>40</sup>, κάτι το οποίο υποστηρίζεται από στοιχεία που βρίσκουν την α-συνουκλεΐνη ικανή να διευκολύνει την αλληλεπίδραση μεταξύ συναπτικών κυστιδίων και να ρυθμίζει τη συναρμολόγησή τους<sup>41,42</sup>. Επιπλέον, η α-συνουκλεΐνη εμπλέκεται στη συναρμολόγηση του προσυναπτικού συμπλέγματος SNARE, όπου ρυθμίζει την απο-διαβάθμιση, την κατανομή και τη διατήρηση της συναρμολόγησης του.

### 2.3 Παθολογία και συσχέτιση της α-συνουκλεΐνης με τη νόσο Πάρκινσον

Πληθώρα μελετών καταδεικνύει τη σχέση μεταξύ της συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης και του φαινοτύπου της νόσου του Πάρκινσον. Τα υψηλά επίπεδα της διαλυτής ολιγομερούς μορφής, αντί της αδιάλυτης μορφής ινιδίων της α-συνουκλεΐνης προτείνεται πλέον ως παθογόνο είδος στην νΠ<sup>43</sup>. Τα διαλυτά ολιγομερή α-συνουκλεΐνης μπορούν να διαταράξουν τις μεμβράνες<sup>44,45</sup> και να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο τόσο σε *in vitro*<sup>46,47</sup> όσο και σε ζωικά μοντέλα<sup>48,49</sup>.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο της SNCA και διπλασιασμός ή τριπλασιασμός του γονιδίου οδηγούν σε οικογενή και σποραδική μορφή της νόσου<sup>50,51</sup>. Έξι επικρατείς μεταλλάξεις (A30P, E46K, A53T, A53E, H50Q, G51D) και μία πρόσφατα αναφερθείσα A53V έχουν αποκαλυφθεί μέχρι σήμερα, οι οποίες συνδέονται γενετικά με κάποια οικογενή μορφή της νόσου<sup>52</sup>.

Η πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη υφίσταται εκτεταμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης, της νιτροζυλίωσης και ουβικουιτίνωσης, οι οποίες φαίνεται να ευνοούν τον ολιγομερισμό<sup>53</sup> και είναι επαυξημένες στους εγκεφάλους των ασθενών με νΠ, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές οι τροποποιήσεις μπορεί να συμβάλλουν στην παθολογία της νΠ. Στους εγκεφάλους με νΠ που περιέχουν σωματία Lewy<sup>54</sup> περίπου το 90% της α-συνουκλεΐνης περιέχει φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο σερίνη-129 (Ser-129), σε αντίθεση με το ~4% στους εγκεφάλους υγιών ατόμων. Η φωσφορυλίωση της α-συνουκλεΐνης στη Ser-129 είναι ικανή να προάγει τη συσσώρευση ολιγομερούς α-συνουκλεΐνης *in vitro*<sup>55</sup>, να επιταχύνει το σχηματισμό α-συνουκλεϊνικών συσσωματώσεων<sup>56</sup>, και να οδηγήσει σε νευρωνική απώλεια όταν συνυπάρχει με ανεβασμένα συνολικά επίπεδα έκφρασης α-συνουκλεΐνης, όπως φάνηκε σε *in vitro* μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν α-συνουκλεΐνη<sup>57,58</sup>. Επιπλέον, μελέτες δείχνουν ότι η υπερφωσφορυλίωση της α-συνουκλεΐνης μπορεί να επηρεάσει τη διαλυτότητα της<sup>59</sup>, τις ιδιότητες δέσμωσης της μεμβράνης και την υποκυτταρική κατανομή της, ευνοώντας έτσι μια παθογόνο κατάσταση<sup>60</sup>.

Μια εναλλακτική οδός συσσώρευσης διαλυτών ολιγομερών α-συνουκλεΐνης αποτελεί η δυσλειτουργία στους μηχανισμούς κάθαρσης της α-συνουκλεΐνης από τα πρωτεολυτικά συστήματα. Το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος είναι κυρίως υπεύθυνο για την αποικοδόμηση των βραχύβιων διαλυτών πρωτεϊνών<sup>61</sup>, ενώ η οδός αυτοφαγίας-λυσώματος αποικοδομεί μακρομόρια μακράς διάρκειας ζωής, κυτταρικά συστατικά και δυσλειτουργικά

οργανίδια<sup>62</sup>. Όσον αφορά το λυσόσωμα, άτομα με ετερόζυγη μετάλλαξη στη λυσοσωμική υδρολάση GCCase (η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο GBA1) παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης σποραδικής νΠ<sup>63</sup>, παρόλο που η μετάλλαξη οδηγεί σε ήπια μείωση στην συνολική ποσότητα GCCase. Πιθανολογείται πως η συσσώρευση του κύριου υποστρώματος της GCCase, του γλυκοσυλκεραμιδίου (GluCer) είναι εν μέρει υπεύθυνο για την αντίστροφη συσχέτιση α-συνουκλεΐνης και GCCase. Το GluCer μπορεί να αλληλεπιδράσει άμεσα με την α-συνουκλεΐνη και να προωθήσει τη διαμορφωτική μετατροπή σε τοξικά ολιγομερή και αμυλοειδογόνα ινίδια<sup>64</sup>. Η αυτοφαγία, και ειδικότερα η αυτοφαγία με τη μεσολάβηση συνοδών (CMA) έχει προταθεί ότι επηρεάζει τον κύκλο εργασιών και τον μεταβολισμό της α-συνουκλεΐνης. Η CMA είναι μια επιλεκτική μορφή αυτοφαγίας που συχνά αξιοποιείται ως αντίδραση στο κυτταρικό στρες<sup>65</sup>.

Υπάρχουν δεδομένα τα οποία υποδηλώνουν πως η α-συνουκλεΐνη μπορεί να επηρεάσει την μιτοχονδριακή ομοιόσταση παρεμβαίνοντας στη σωστή δυναμική της σύντηξης/διάσπασης των μιτοχονδρίων, επηρεάζοντας τη δυναμική εισαγωγής πρωτεϊνών καθώς και να οδηγήσει σε αναστολή του μιτοχονδριακού συμπλέγματος I<sup>66</sup>, δυσλειτουργίες οι οποίες συνυπάρχουν με την νΠ. Δεδομένης της συγγένειας της α-συνουκλεΐνης για μεμβράνες υψηλής καμπυλότητας, ανθεκτικές σε απορρυπαντικά, εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη, σφιγγολιπίδια και όξινα φωσφολιπίδια όπως η καρδιολιπίνη<sup>67,68</sup>, η συσχέτιση α-συνουκλεΐνης με τα μιτοχόνδρια μελετάται εκτενώς. Μετά τη δέσμευση σε λιπιδικές μεμβράνες και κυστίδια, η α-συνουκλεΐνη είναι ικανή να υιοθετήσει αμφίπαθη δομή α-έλικας, η οποία θεωρείται ότι αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην αρχική διαδικασία του ολιγομερισμού καθώς ευνοεί το σχηματισμό ινιδίων<sup>69,70</sup>.

Μια εναλλακτική οδός επιδείνωσης της βιωσιμότητας των ντοπαμινεργικών νευρώνων σε περιπτώσεις συσσώρευσης α-συνουκλεΐνης είναι μέσω της επαγωγής φλεγμονής<sup>24</sup>. Ο εγκέφαλος είναι εξαιρετικά ευάλωτος στο οξειδωτικό στρες σε σύγκριση με τα περιφερειακά όργανα λόγω των υψηλών επιπέδων πολυακόρεστων λιπαρών και της σχετικά χαμηλής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας<sup>71</sup>. Τόσο τα πρωτο-ινίδια τα οποία ενδοκυτταρόνται από την μικρογλοία στα πλαίσια αποπτωτικού θανάτου των νευρώνων, ή μέσω μηχανισμών κυτταρικής απελευθέρωσης<sup>72,73</sup>, όσο και η σηματοδότηση μέσω κυτταροκινών η οποία εκκρίνεται από τους επηρεασμένους νευρώνες έχουν την ικανότητα να οδηγήσουν στην ενεργοποίησή της μικρογλοίας και επάγουν αυξημένη παραγωγή ROS<sup>73,74</sup> και φαγοκυτταρική δραστηριότητα<sup>25</sup>. Η ενεργοποιημένη μικρογλοία με την σειρά της εκκρίνει IL-1α, TNF-α και πρωτεΐνη συμπληρώματος C1Q, μόρια ικανά να προκαλέσουν τα αστροκύτταρα να υιοθετήσουν μια προφλεγμονώδη "A1" μοίρα, πράγμα που σημαίνει πως δεν συμμετέχουν πια στο σχηματισμό συνάψεων, χάνουν τη φαγοκυτταρική τους δραστηριότητα και είναι άμεσα νευροτοξικά<sup>75</sup>. Τέλος, τα πεπτίδια που προέρχονται από την α-συνουκλεΐνη δρουν ως αντιγονικοί επίτοποι και μεσολαβούν σε απαντήσεις βοηθητικών και κυτταροτοξικών T κυττάρων σε ασθενείς με νΠ<sup>26</sup>. Το παρών, σε συνδυασμό με τα δεδομένα πως τα ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα αλλά και οι ανθρωπίνοι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που μπορούν να ενεργοποιήσουν τα T κύτταρα<sup>76</sup> πιθανόν να επιταχύνει τον μεσολαβούμενο από T κύτταρα θάνατο των ντοπαμινεργικών νευρώνων.

### 3.Ρυθμιση του mRNA μέσα από το 3'UTR

#### 3.1 Εναλλακτική πολυαδενυλίωση

Η ωρίμανση των υπό μεταγραφή mRNA περιέχει πληθώρα διαδικασιών οι οποίες επηρεάζουν το πεπρωμένο του τελικού ώριμου mRNA. Κατά την επεξεργασία των 3' άκρων, στο στάδιο των πρόδρομων αγγελιοφόρων RNA (pre-mRNAs), το 3' άκρο του εκκολλαπτόμενου mRNA διασπάται, ακολουθούμενο από την προσθήκη μιας πολυ(A) ουράς (γνωστή ως πολυαδενυλίωση<sup>77</sup>). Η πολυαδενυλίωση προστατεύει το προ-mRNA από την ενζυματική αποικοδόμηση και διευκολύνει την πυρηνική εξαγωγή και τη μετάφραση<sup>78</sup>. Τόσο η διάσπαση όσο και η πολυαδενυλίωση λαμβάνουν χώρα σε θέσεις πολυαδενυλίωσης (polyadenylation site, PASs) οι οποίες βρίσκονται εντός των 3' αμετάφραστων περιοχών (3'UTRs) επονομαζόμενα tandem 3'UTR-APAs, των ιντρονίων ή των εσωτερικών εξονίων (οπότε και αποκαλείται ΑΠΑ ανοδικής περιοχής (UR-APAs)<sup>79,80</sup>. Τα περισσότερα ευκαρυωτικά γονίδια περιέχουν πολλαπλές PASs. Μια συντηρημένη εξαμερής αλληλουχία AAUAAA<sup>81</sup>, η οποία βρίσκεται ανοδικά των PASs, περιέχει το σήμα της διάσπασης και της πολυαδενυλίωσης του προ-mRNA. Τόσο αυτό το κανονικό σήμα poly(A) όσο και τα PASs είναι ευρέως διαδεδομένα στο ευκαρυωτικό mRNA. Η διάσπαση ή η πολυαδενυλίωση μπορεί να δημιουργήσει ισομορφές μεταγράφου που διαφέρουν ως προς τις κωδικοποιητικές περιοχές ή τις 3'UTR<sup>82</sup>. Το φαινόμενο αυτό, το οποίο οδηγεί σε διάφορες ισομορφές μεταγράφου, ονομάζεται εναλλακτική πολυαδενυλίωση (ΕΠΑ). Η ΕΠΑ ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1980 στα γονίδια που κωδικοποιούν την ανοσοσφαιρίνη Μ (IgM) και τη διυδροφυλλική αναγωγή (DHFR)<sup>83,84</sup>. Τα tandem 3'UTR-APAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα του mRNA, τη μεταφραστική αποτελεσματικότητα, την πυρηνική εξαγωγή, τον κυτταρικό εντοπισμό και τον εντοπισμό της κωδικοποιημένης πρωτεΐνης. Τα UR-APAs έχουν βρεθεί εμπλεκόμενα στον κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική διαφοροποίηση με πολλούς τρόπους, όπως σε πτυχές της πρωτεϊνικής διαφοροποίησης και της αναστολής της γονιδιακής έκφρασης<sup>85,86</sup>. Καθώς οι μακρύτερες ισομορφές μπορούν να περιλαμβάνουν πρόσθετες θέσεις πρόσδεσης ρυθμιστικών trans μορίων (ή αντιστρόφως οι βραχείς ισομορφές διαφεύγουν του ελέγχου ορισμένων πρωτεϊνών δέσμευσης RNA (RBP) και miRNA) μεταγράμματα με πιο εγγύς APA δεν διαθέτουν τις απαραίτητες θέσεις πρόσδεσης RBP ή στοιχεία εντοπισμού, η ετερογένεια του 3' UTR μπορεί να οδηγήσει σε μεταγράμματα με διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες. Σε γενικές γραμμές, τα mRNA με σύντομο 3'UTR αποικοδομούνται πιο αργά και οδηγούν σε μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης από εκείνα των επιμηκυμένων υποτύπων. Αυτό μπορεί να παρέχει ενδείξεις για τον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με τη νόσο και την αποκάλυψη βασικών πτυχών της παθογένειας της νόσου<sup>87</sup>.



### 3.2 Κύριοι παράγοντες επεξεργασίας του 3' άκρου του προ-mRNA.

Ο βασικός μηχανισμός επεξεργασίας του 3'-τελους αποτελείται από τέσσερα κύρια σύμπλοκα: τον παράγοντα εξειδίκευσης της διάσπασης και πολυαδενυλίωσης (CPSF) αποτελούμενο από διμερή τα οποία μπορούν να αναγνωρίσουν και να αλληλεπιδράσουν με στοιχεία πλούσια σε U και GU καθοδικά του PAS, τον παράγοντα διάσπασης I (CFI<sub>m</sub>) το οποίο αλληλεπιδρά κατά προτίμηση με απομακρυσμένες θέσεις πολυ(A) σε τερματικά εξώνια για να ενισχύσει την απομακρυσμένη χρήση PAS, τον παράγοντα διάσπασης II (CFI<sub>II</sub>) το οποίο στοχεύει τη θέση διάσπασης η οποία βρίσκεται κατά προτίμηση μετά από μια κυτοσίνη και τον παράγοντα διέγερσης της διάσπασης (CstF)<sup>88,89</sup>. Το σήμα πολυαδενυλίωσης AAUAAA βρίσκεται 15-30 νουκλεοτίδια ανοδικά της διάσπασης και του PAS. Οι υπομονάδες WD repeat domain 33 και CPSF-30 αναγνωρίζουν το σήμα πολυαδενυλίωσης, ενώ η CPSF-73 είναι η ενδονουκλεάση που κόβει το προ-mRNA στη θέση διάσπασης μεταξύ ενός δινουκλεοτιδίου κυτοσίνης/αδενίνης (CA). Μόλις αυτά τα σύμπλοκα συναρμολογηθούν στο προ-mRNA, η πολυ(A) πολυμεράση (PAP) στρατολογείται και διεγείρεται από την πυρηνική πρωτεΐνη δέσμησης πολυ(A) για να προσθέσει ουρά πολυ(A) στη θέση διάσπασης. Το σύμπλοκο CPSF μπορεί να αναγνωρίσει το εξαμερές AAUAAA και να συνδεθεί απευθείας στην περιοχή poly(A) μέσω των CPSF4 και WDR33. Έχει διαπιστωθεί ότι το σύμπλοκο CFI μπορεί να βοηθήσει το CPSF να αλληλεπιδράσει πιο σταθερά με τις PAS<sup>90</sup>.

Η ετερογένεια που προκύπτει στα 3'UTR μπορεί να οδηγήσει τα μεταγράμματα που εμπλουτίζονται σε διαφορετικά διαμερίσματα του κυττάρου. Η ΕΠΑ είναι επίσης ένας σημαντικός ρυθμιστής της αξονικής σηματοδότησης, με την εντοπισμένη μετάφραση των mRNA να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην αξονική συντήρηση και επιδιόρθωση. Η περαιτέρω ανάλυση μπορεί να αποκαλύψει εάν το 3' άκρο ενός εντοπισμένου RNA σχετίζεται μοναδικά με τον αποτελεσματικό εντοπισμό στα διάφορα κλάσματα. Η επιλογή του άκρου 3'UTR επηρεάζει τον εντοπισμό, καθώς οι μακρύτερες ισομορφές μπορούν να περιλαμβάνουν πρόσθετες θέσεις πρόσδεσης RBP, όπου τα μεταγράμματα με πιο εγγύς ισομορφές δεν διαθέτουν τις απαραίτητες θέσεις πρόσδεσης RBP ή στοιχεία εντοπισμού.

Σε πολωμένους τύπους κυττάρων, όπως οι νευρώνες, οι ισομορφές mRNA που χρησιμοποιούν κατά προτίμηση την απομακρυσμένη PAS έχει αποδειχθεί ότι εντοπίζονται στους νευρίτες, ενώ οι ισομορφές που χρησιμοποιούν την εγγύς PAS είναι εμπλουτισμένες στα κυτταρικά σώματα<sup>91</sup>. Για ορισμένα γονίδια, οι ισομορφές ΕΠΑ εντοπίζονται διαφορετικά μεταξύ αυτών των διαμερισμάτων. Αυτό έχει μελετηθεί διεξοδικά για δύο γονίδια σε δύο συστήματα: το *Impr1* του αρουραίου και το *BDNF* του ποντικού<sup>92,93</sup>.



## 5. Η πρωτεΐνη AUF1

### 5.1 Το γονίδιο και η δομή της AUF1

Η AUF1 ανήκει στην ομάδα πρωτεϊνών HNRNP, το γονίδιο του εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 4q21.1-q21.2 και κωδικοποιεί τέσσερις ισομορφές ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος των εξωνίων 2 και 7 (Εικόνα 6). Ξεκινώντας από την μικρότερη, η ισομορφή p37AUF1 στερείται και τα δύο εξώνια 2 και 7, η p40AUF1 περιέχει το εξώνιο 2 αλλά στερείται το εξώνιο 7, η p42AUF1 περιέχει το εξώνιο 7 αλλά στερείται το εξώνιο 2 και η p45AUF1 περιέχει ολόκληρη την κωδική αλληλουχία AUF1<sup>102,103</sup>. Και οι τέσσερις ισομορφές AUF1 περιέχουν συντηρημένες περιοχές, συμπεριλαμβανομένων δύο διατεταγμένων σε σειρά, μη πανομοιότυπων μοτίβων αναγνώρισης RNA (RRM). Οι ισομορφές διαφέρουν ως προς την συγγένεια σε περιοχές πλούσιες σε AU, με τις ισομορφές p37 και p42 να εμφανίζουν έως και πενταπλάσια από ό,τι οι p40 και p45, γεγονός που θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα του αποκλεισμού του εξωνίου 7. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός είναι ένα ακόμα σημείο στο οποίο διαφέρουν, με τις ισομορφές p42 και p45 να εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα σε αντίθεση με τις p37.



**Εικόνα 6.** Το γονίδιο AUF1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 4 και εναλλακτικό μάτισμα οδηγεί στην παραγωγή τεσσάρων ισομορφών. Η ισομορφή p37AUF1 στερείται και τα δύο εξώνια 2 και 7, η p40AUF1 περιέχει το εξώνιο 2 αλλά στερείται το εξώνιο 7, η p42AUF1 περιέχει το εξώνιο 7 αλλά στερείται το εξώνιο 2 και η p45AUF1 περιέχει ολόκληρη την κωδική αλληλουχία AUF1<sup>102</sup>.

### 5.2 Μηχανισμός δράσης της AUF1

Η AUF1 έχει αποδειχθεί ότι δρα ως παράγοντας αποικοδόμησης ARE-mRNA και περιστασιακά ως παράγοντας σταθεροποίησης ARE-mRNA, αν και η συναίνεση είναι ότι λειτουργεί κυρίως για την προώθηση της ταχείας αποικοδόμησης του mRNA<sup>104</sup>. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η δράση της AUF1 επηρεάζει την σταθερότητα των στόχων της παραμένουν ασαφείς, υπάρχουν όμως ορισμένες υποθέσεις. Ο πρώτος μηχανισμός επιταχύνει την αποσταθεροποίηση του mRNA μέσω του 3' νουκλεόλυσης. Παρόλο που η AUF1 δεν φαίνεται να διαθέτει εγγενή νουκλεολυτική δραστηριότητα, υπάρχουν ενδείξεις πως στρατολογεί το σύστημα εξωνουκλεάσης<sup>105</sup>, χωρίς όμως να έχει δειχθεί πως επηρεάζει το βήμα στενωπό της διαδικασίας, την αποαδενυλίωση. Η ουρά πολυ(A) του mRNA δεσμεύεται αρχικά από πολλαπλά αντίγραφα της πρωτεΐνης δέσμευσης πολυ(A) (PAB). Η CCR4 ενεργοποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων με την PAB. Η αποικοδόμηση από την CCR4 αφαιρεί τη θέση πρόσδεσης της PAB, απελευθερώνοντας ένα μονομερές από το mRNA.

Η ελεύθερη αλληλουχία 30 poly(A) είναι τώρα ένα ακατάλληλο υπόστρωμα για την CCR4 αλλά ιδανικό για την CNOT7. Η αποικοδόμηση από την CNOT7 απομακρύνει την ελεύθερη ουρά A, αλλά αναστέλλεται από το επόμενο μονομερές PAB. Ένας εναλλακτικός μηχανισμός άσκησης ελέγχου στους στόχους των AUF1 είναι η συνεργασία με τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης μέσα από τα miRNA. Η πρόσδεση του AUF1 σε επιλεγμένα miRNA ενισχύει τη συναρμολόγησή τους σε σύμπλοκα AGO2. Επιπλέον, η πρόσδεση του AUF1 σε στόχους mRNA μπορεί να ενισχύσει ή και να αναστείλει τη στρατολόγηση και τη λειτουργία του miRISC σε θέσεις-στόχους. Τέλος, ο AUF1 μπορεί να περιορίσει την παραγωγή miRNA καταστέλλοντας την έκφραση του DICER, ενώ παράλληλα ρυθμίζεται αμοιβαία ο ίδιος από επιλεγμένα miRNA<sup>106</sup>.

### 5.3 Συσχέτιση της AUF1 με παθολογία

Δεδομένου πως περίπου το 16% όλων των ανθρώπινων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από mRNAs που περιέχουν μια αλληλουχία ARE εντός του 3' UTR τους<sup>107</sup>, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός πως η AUF1 έχει βρεθεί εμπλεκόμενη σε μεγάλο εύρος φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών<sup>103</sup>. Η AUF1 έχει βρεθεί να ελέγχει τις προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNFα και IL-1β σε AUF1-null μοντέλα μυών<sup>108</sup>. Επιπλέον, τα ποντίκια AUF1-null αναπτύσσουν χρόνια, αυθόρμητη φλεγμονώδη δερματίτιδα που χαρακτηρίζεται από κνησμό και εξανθήματα<sup>109</sup>. Η AUF1 ρυθμίζει επίσης την έκφραση πολλών mRNA, τα προϊόντα των οποίων χειρίζονται διαδικασίες που σχετίζονται με την ανάπτυξη όγκων, καθώς αυτά συχνά περιλαμβάνουν 3'UTR ARE-τύπου αλληλουχίες. Τα τρέχοντα στοιχεία δείχνουν ότι η AUF1 μπορεί να ασκεί προ- και αντι-ογκογονικούς ρόλους σε διαφορετικά κυτταρικά πλαίσια<sup>110,111</sup>. Η καρδιακή παθολογία έχει συνδεθεί με αυξημένα επίπεδα AUF1, πιο συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του AUF1 είναι σημαντικά αυξημένα στον ιστό του κοιλιακού μυοκαρδίου από ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου<sup>112</sup>. Και οι τέσσερις ισομορφές AUF1 εκφράζονται στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, με τις p40AUF1 και p42AUF1 να εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης<sup>113</sup>. Μέσω της αλληλεπίδρασής της με τις πρωτεΐνες HDAC1 και MTA2, η AUF1 θεωρείται ότι συντονίζει τη γονιδιακή έκφραση στα διάφορα στάδια της εξέλιξης του νευρικού σωλήνα, προσλαμβάνοντας μόρια αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης σε στοιχεία DNA πλούσια σε AT<sup>114</sup>. Τέλος, στο επίπεδο της νόσου του Πάρκινσον, η AUF1 έχει βρεθεί να δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της πρωτεΐνης LRRK2<sup>115</sup>.

## 6. hnRNPA1

### 6.1 Το γονίδιο και η δομή της hnRNPA1

Το γονίδιο hnRNPA1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12q13.13 και έχει δύο κύριες χαρακτηρισμένες ισομορφές, την hnRNP A1-A και την hnRNP A1-B, με την hnRNP A1-A να εκφράζεται έως και 20 φορές πιο άφθονα, ιδίως στα νευρωνικά κύτταρα<sup>116</sup>. Όπως και άλλα μέλη της υποοικογένειας hnRNP(A/B), και οι δύο ισομορφές hnRNPA1 χωρίζονται ομοίως σε δύο κύρια δομικά τμήματα: ένα N-τελικό τμήμα που περιλαμβάνει δύο RRM's και ένα C-τελικό τμήμα γνωστό ως prion-like domain (PrLD), το οποίο μεσολαβεί στην κυτταρική διαμερισματοποίηση, την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και τη δέσμευση RNA<sup>117</sup> (Εικόνα 7). Παρόλο που και οι δύο RRM μοιράζονται υψηλό βαθμό ομολογίας δεν είναι πλεονάζουσες και λειτουργούν ως λειτουργικά διακριτές περιοχές,

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ικανές να προσδένονται σε διαφορετικά RNA και mRNA<sup>118,119</sup>. Η εξειδίκευση πρόσδεσής τους στην αλληλουχία, ωστόσο, είναι παρόμοια, καθώς η hnRNP1 προτιμά να προσδένεται σε στοιχεία πλούσια σε AU (AREs), ή UAGGGA(U)-μοτίβα που υπάρχουν στις 3'-μη μεταφραζόμενες περιοχές (3'-UTR) των μεταγράφων αγγελιοφόρων RNA<sup>120,121</sup>. Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του C-τελικού άκρου του hnRNP1 έδειξε ότι το hnRNP1 περιλαμβάνει μια περιοχή αργινίνης-γλυκίνης-γλυκίνης (RGG domain) υπεύθυνη για την ειδικότητα και τη δύναμη πρόσδεσης RNA, τη δέσμευση και το ξεδίπλωμα του G-τετράπλευρου DNA και στη διαμεσολάβηση αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης<sup>122,123</sup>, και μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού/εξαγωγής (NLS/NES) 38 αμινοξέων, που αναφέρεται ως M9<sup>124</sup>.



**Εικόνα 7.** Σχηματική απεικόνιση της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης hnRNP1. Περιλαμβάνει δύο RNA-recognition motifs (RRMs) και ένα C-τελικό τμήμα γνωστό ως prion-like domain (PrLD), το οποίο με τη σειρά του περιλαμβάνει μια περιοχή αργινίνης-γλυκίνης-γλυκίνης (RGG domain) και μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού/εξαγωγής (NLS/NES) γνωστή ως M9<sup>125</sup>.

### 6.2 Μηχανισμός δράσης της hnRNP1

Η hnRNP1 παίρνει μέρος σε πλήθος διαδικασιών τόσο σε DNA όσο και σε RNA στόχους. Πρώτον, έχει βρεθεί πως η hnRNP1 επιδρά στην έναρξη της μεταγραφής είτε καταστέλλοντας τη δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων, είτε επάγοντας την μέσω της πρόσδεσης και της αποσταθεροποίησης δομών G-τετράπλεξ εντός των υποκινητών των γονιδίων<sup>126,127</sup>. Στο επίπεδο του DNA αξίζει να σημειωθεί πως η hnRNP1 εμπλέκεται στην συντήρηση των τελομερών υποβοηθώντας την σύνδεση της τελομεράσης με το τελομερικό άκρο<sup>128</sup>. Ο ρόλος της hnRNP1 στο spliceosome έχει μελετηθεί εκτενώς στο πλαίσιο των νευροεκφυλιστικών ασθενειών, με την hnRNP1 να προωθεί τον αποκλεισμό εξωνίων στο mRNA ακόμα και στο ίδιο του mRNA, πιθανόν ώστε να μετριαστεί η τοξικότητα<sup>129</sup>. Το hnRNP1, ωστόσο, μπορεί επίσης να επηρεάσει τη μετάφραση των mRNAs, καθώς είναι ένας εσωτερικός παράγοντας ενεργοποίησης της θέσης εισόδου στο ριβόσωμα (IRES), ο οποίος δεσμεύει αλληλουχίες IRES και ρυθμίζει την είσοδο στο ριβόσωμα ή/και την ανάγνωση του μεταγράφου<sup>130</sup>. Η hnRNP1 ρυθμίζει επίσης τη μετάφραση μέσω της πρόσδεσης στο 3' UTR των mRNAs - η λειτουργία αυτή ορίστηκε αρχικά με τη δέσμευση του hnRNP1 σε στοιχεία πλούσια σε AU (AREs) στα mRNAs και τη μείωση της μεταφραστικής δραστηριότητας των mRNAs<sup>131</sup>. Η hnRNP1 εμπλέκεται επίσης στην τοποθέτηση των μεταγράφων, περιλαμβανομένης της μεταφοράς mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και της δυναμικής των κοκκίων στρες<sup>132</sup>. Τέλος, Το hnRNP1 έχει δειχθεί πως προσδένεται στο πρωτογενές miRNA (pri-miRNA) δύο γνωστών microRNAs (miRNAs), των pri-miR-18a και pri-Let-7 στον πυρήνα και θεωρείται ότι προωθεί τη διάσπαση σε προ-miRNA προωθώντας τη δέσμευση της πρωτεΐνης Drosha<sup>133,134</sup>.

### 6.3 Φυσιολογική και παθολογική δράση της hnRNP1

Ως αποτέλεσμα της ευρείας γκάμας διαδικασιών στις οποίες λαμβάνει μέρος η hnRNP1, διακυμάνσεις στα επίπεδά της αλλά και μεταλλάξεις έχουν συνδεθεί με παθογενείς καταστάσεις<sup>125</sup>. Υψηλά επίπεδα HNRPA1 έχουν συνδεθεί με αναστολή της απόπτωσης μέσω της διαφορικής έκφρασης αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως οι CIAP, XIAP, και BCLXL<sup>135</sup>. Το παρών, σε συνδυασμό με την βλάβη του μηχανισμού συντήρησης των τελομερών σε περιπτώσεις μεταβολής των επιπέδων της HNRPA1 και με την παρατήρηση πως η HNRPA1 συμβάλλει στο εναλλακτικό μάτισμα στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες σημαντικής στη μετάσταση CD44 υποδεικνύουν την HNRPA1 ως ρυθμιστική πρωτεΐνη στο καρκίνο<sup>136</sup>. Η hnRNP1 έχει παρατηρηθεί να διαδραματίζει τόσο αντι-ικό ρόλο, όπως στην περίπτωση του ανθρώπινου Τ-Λεμφοτρόπου Ιού 1 (HTLV-1) όπου αναστέλλει τη δέσμευση της Rex πρωτεΐνης στο στοιχείο απόκρισης (Rex response element, RxE ή XRE)<sup>137</sup>, αλλά και υποβοηθητικό ρόλο όπως στην περίπτωση μοντέλου επιμόλυνσης από τον ιό Sindbis, όπου η hnRNP1 εντοπίζεται στη κυτταροπλασματική θέση ιικής αντιγραφής, προσδέεται στο 5'UTR του ιικού RNA και προωθεί την σύνθεση του αρνητικού κλώνου (G and SG RNA)<sup>138</sup>. Η σχέση της hnRNP1 έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς την αλληλεπίδρασή της με νευροεκφυλιστικές ασθένειες<sup>125</sup>. Μεταλλάξεις που εντοπίζονται στην PrLD της hnRNP1 έχουν συσχετιστεί με μορφές πλαγίας αμυοτροφικής σκλήρυνσης (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) όπως και την μετωποκροταφική εκφύλιση (Frontotemporal lobar degeneration, FTLD) και έχει προταθεί ότι επηρεάζουν τη συσσωμάτωση της αδιάλυτης πρωτεΐνης hnRNP1<sup>139</sup>. Όσον αφορά την νωτιαία μυϊκή ατροφία (Spinal muscular atrophy, SMA), η μεσολάβηση του hnRNP1 στο εναλλακτικό μάτισμα του SMN2 οδήγησε στον αποκλεισμό του εξωνίου 7 του<sup>140</sup>. Ο ρόλος της HNRPA1 στο εναλλακτικό μάτισμα φαίνεται και στην περίπτωση της νΑ, όπου υπερέκφραση της οδήγησε στο να συμπεριληφθούν τα εξώνια 7-8 στο mRNA του APP, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή β-αμυλοειδούς<sup>141</sup>. Άλλη μελέτη δείχνει ότι η hnRNP1 επηρεάζει τη νΑ μέσω της διαμόρφωσης του ματίσματος της TAU. Οι συγγραφείς δείχνουν ότι η hnRNP1 προωθεί τον σχηματισμό του mRNA 3R-TAU μέσω του αποκλεισμού του εξωνίου 10<sup>142</sup>. Τέλος, έχει προταθεί πως η hnRNP1 επηρεάζει τη νόσο του Χάντινγκτον (νΧ) ρυθμίζοντας την έκφραση της πρωτεΐνης DRP1 μετα-μεταγραφικά μέσω της σύνδεσής της με το 3' UTR του mRNA της DRP1<sup>143</sup>. Χαμηλά επίπεδα HNRPA1 επέφεραν μείωση της μετάφρασης της DRP1 με αποτέλεσμα την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.

# ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

## Σκοπός της μελέτης

Η SNCA είναι μια προσυναπτική πρωτεΐνη που δρα ως συνοδός για το σύμπλεγμα SNARE, ρυθμίζοντας τη συναπτική νευροδιαβίβαση. Η συσσώρευση της SNCA έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη ενός εύρους ασθενειών γνωστών με τον όρο α-συνουκλεινοπάθειες, περιλαμβανομένης της νόσου του Πάρκινσον (νΠ), της ατροφίας πολλαπλών συστημάτων (MSA) και της άνοιας με σωματίδια Lewy (LBD). Η διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων έκφρασης της SNCA είναι απαραίτητη για τη νευρική λειτουργία και βιωσιμότητα. Η κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση της SNCA είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη πιθανών θεραπευτικών παρεμβάσεων. Μέχρι σήμερα η διεξαγωγή έρευνας έχει επικεντρωθεί στη διαλεύκανση της μεθόδου με την οποία ελαττώματα σε επιλεγμένα μονοπάτια σύνθεσης ή καταβολικές διεργασίες όπως το πρωτεάσωμα και η αυτοφαγία οδηγούν σε μη φυσιολογική έκφραση και εν τέλει συσσώρευση της πρωτεΐνης SNCA. Ανοδικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί πιθανοί να διαμορφώσουν το 'πέπρωμένο' της α-συνουκλειΐνης πριν την μετάφρασή του έχουν διερευνηθεί σε σαφώς μικρότερο βαθμό. Μελέτες έχουν αναφέρει μεταλλάξεις στο SNCA 3'UTR που συνδέονται με τη νΠ<sup>28,144-146</sup> και αλλαγές στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση του SNCA mRNA σε ασθενείς με νΠ<sup>28,147</sup>, αναδεικνύοντας τη συμβολή των ρυθμιστικών στοιχείων του SNCA 3'UTR στην έκφραση της πρωτεΐνης SNCA.

Για τον εντοπισμό πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με το SNCA 3'UTR, σε προηγούμενη δουλειά στο εργαστήριο συντέθηκε βιοτινυλιωμένο RNA που καλύπτει τις 2520 βάσεις του 3'UTR, το οποίο επώαστηκε με ολικό εγκεφαλικό λύμα μυών. Ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα κατακρημνίσθηκαν με χρήση μαγνητικών σφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη και πραγματοποιήθηκε ανάλυση nano LC-MS/MS για την ταυτοποίηση όλων των αλληλοεπιδρώντων πρωτεϊνών, βρίσκοντας σημαντικό εμπλουτισμό σε πρωτεΐνες δέσμησης RNA (RBPs). Δεκαεπτά από αυτές τις 'κλασικές' RBPs κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδια έκφρασης και σε πιλοτικά πειράματα για την επίδραση τους στο mRNA και την μετάφραση της α-συνουκλειΐνης ξεχώρισαν οι πρωτεΐνες AUF1 και hnRNPA1 ως πιθανοί αρνητικοί ρυθμιστές της α-συνουκλειΐνης.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν χαρτογράφηση των σημείων στον κύκλο ζωής του mRNA της α-συνουκλειΐνης στα οποία ασκείται ρυθμιστικός έλεγχος από τις πρωτεΐνες AUF1 και hnRNPA1, η διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων ασκείται αυτός ο έλεγχος, και εν τέλει η εξέταση της επίδρασης του συνόλου των αλληλεπιδράσεων στα πρωτεϊνικά επίπεδα της α-συνουκλειΐνης.



# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## Υλικά

### Κυτταρικά συστήματα

#### *SK-N-SH Κύτταρα Νευροβλαστώματος Ανθρώπου*

Πρόκειται για κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπου που χρησιμοποιούνται ευρέως σαν πρότυπο σύστημα μελέτης. Τα SH-SY5Y προκύπτουν από τα SK-N-SH, τα οποία με τη σειρά τους απομονώθηκαν από μεταστατικό καρκίνο μυελού των οστών από ένα κορίτσι ηλικίας 4 χρονών.

#### *HEK293 Κύτταρα Ανθρώπινου Νεφρού*

Πρόκειται για ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού τα οποία αναπτύσσονται εύκολα σε κυτταροκαλλιέργειες και παρουσιάζουν υψηλή τάση για διαμόλυνση (μέχρι και 100%). Χρησιμοποιήθηκαν για επιβεβαίωση των πειραμάτων συν-ανοσοκατακρήμνισης.

#### *CAD Κατεχολαμινεργικά Κύτταρα Μυός*

Τα κύτταρα CAD (Cath.-a-differentiated) είναι μια παραλλαγή μιας κατεχολαμινεργικής κυτταρικής σειράς του ΚΝΣ που δημιουργήθηκε από όγκο εγκεφάλου σε διαγονιδιακού μυός που φέρει άγριου τύπου αντιγόνο SV40 T υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή υδροξυλάσης τυροσίνης αρουραίου. Η CAD έχει χάσει το ογκογονίδιο που αθανατοποιεί και εκφράζει πρωτεΐνες ειδικές για τους νευρώνες και πρωτεΐνες συναπτικών κυστιδίων. Το CAD διαφοροποιείται μετά από αφαίρεση ορού για να σχηματίσει νευρωνικές διεργασίες.

### Φορείς κλωνοποίησης

#### *Πλασμιδιακός φορέας pENTR.CMV*

Ο πλασμιδιακός φορέας pENTR.CMV (#32688, Addgene) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των γονιδίων α-συνουκλείνης, TIA1, β-γαλακτοζιδάση, GFP και των shRNA-TIA1 και αρνητικού ελέγχου. Ο φορέας pENTR.CMV διαθέτει: α) γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη, απαραίτητο για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών E. Coli που φέρουν τον σωστό φορέα, β) τον υποκινητή CMV ανοδικά των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης, γ) πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης για την ενσωμάτωση των αλληλουχιών προς μελέτη.

#### *Πλασμιδιακός φορέας pAd/BLOCK-iT-DEST*

Ο πλασμιδιακός φορέας pAD/BLOCK-iT-DEST (PVTY00782, Bioactiva Diagnostica GmbH) χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά του CMV και των γονιδίων α-συνουκλείνης, TIA1, β-γαλακτοζιδάσης και GFP από τον πλασμιδιακό φορέα pENTR.CMV και στη συνέχεια, για την παραγωγή ιικών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα επιμόλυνσης. Ο φορέας pAD/BLOCK-iT-DEST διαθέτει: α) γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, απαραίτητο για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών E. coli που φέρουν τον σωστό φορέα, β) τις περιοχές attR1, attR2 απαραίτητες για τον ανασυνδυασμό με τα attL1 και attL2 του pENTR.CMV και γ) γονίδιο ανθεκτικότητας στην χλωραμφενικόλη, απαραίτητο για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών E. coli που φέρουν τον σωστό φορέα.

#### *Πλασμιδιακός φορέας paaV-CAG-pre-mGRASP-mCerulean-2A-nls-mCherry*

Ο πλασμιδιακός φορέας paaV-CAG-pre-mGRASP-mCerulean-2A-nls-mCherry (#34911, Addgene), χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ευθύγραμμου τμήματος έπειτα από την αφαίρεση των

τμημάτων που κωδικοποιούν. Ο φορέας αυτός διαθέτει: α) γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη, απαραίτητο για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών NEB Stable που φέρουν τον σωστό φορέα, β) τον υποκινητή CAG ανοδικά των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης που επιτρέπει τον υψηλό αριθμό προϊόντων, γ) πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης για την ενσωμάτωση των αλληλουχιών προς μελέτη.

#### Λοιποί πλασμιδιακοί φορείς

*Πλασμιδιακοί φορείς Ub-G76V-GFP, Ub-R-GFP και Ub-M-GFP*

Οι πλασμιδιακοί φορείς Ub-G76V-GFP (#11941) , Ub-R-GFP (#11939) και Ub-M-GFP (#11938)(Addgene) χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση του μονοπατιού ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος<sup>148</sup>

*Πλασμιδιακοί φορείς pRluc-LC3wt, pRluc-LC3G120A, pQCXI Puro DsRed-LC3-GFP*

Οι πλασμιδιακοί φορείς pRluc-LC3wt (#105002), pRluc-LC3G120A (#105003) και pQCXI Puro DsRed-LC3-GFP (#31182) Addgene, χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αυτοφαγικής ροής<sup>149,150</sup>

#### Φαρμακολογικοί αναστολείς

- Erochomicin: αναστολείς πρωτεασώματος, προϊόντα της εταιρείας Abcam.
- Ακτινομυκίνη D: αναστολέας της μεταγραφής, προϊόν MedChemExpress.
- 5,6-Διχλωρο-1-β-D-ριβοφουρανοσυλβενζιμιδαζολη (DRB): αναστολέας της μεταγραφής, προϊόν Cayman Chemical.

Χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την καλλιέργεια των κυττάρων, τη διαμόλυνση και την επιμόλυνση

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - high glucose: Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- Πολυ-λυσίνη: (Poly-D-Lysine), Sigma Aldrich
- Ορός εμβρύου βοός: ThermoFisher Scientific, Reinach, Switzerland.
- Θρυψίνη: Sigma-Aldrich.
- Μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης,; Sigma-Aldrich.
- Η διαμόλυνση των κυττάρων SK-N-SH, στα πειράματα επισήμανσης εγγύτητας, έγινε με τη χρήση των αντιδραστηρίων JetPrime & JetOptimus, Polyplus.

Διάλυμα-Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο ανοσοσύστημα κατά Western

- Διάλυμα λύσης κυττάρων: 25 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.16% Sodium Deoxycholate, 0.16% SDS
- Μείγμα δεικτών γνωστού μοριακού βάρους για τις πρωτεΐνες: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#SM0671), ThermoFisher Scientific.
- Laemmli Buffer 6X: 375 mM Tris pH 6.8, 10% SDS, 50% glycerol, 10% mercaptoethanol, 0.03% bromophenol blue. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους -20 °C.

- Το αντιδραστήριο Bradford: Χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, προϊόν της εταιρείας Bio-Rad, Hercules, CA, USA.
- Protran® μεμβράνες νιτροκυτταρίνης: Χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφορά των πρωτεϊνών και ήταν της εταιρείας Whatman, Kent, UK.
- Αντιδραστήρια ECL: Χρησιμοποιήθηκαν για την ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, της εταιρείας BioRad
- SDS-PAGE 5X (Running Buffer): 15.1 g/lit Tris-Base και 72 g/lit γλυκίνης σε ddH<sub>2</sub>O. Στο τελικό διάλυμα προστέθηκε SDS έτσι ώστε να έχει περιεκτικότητα 0.1 %.
- Transfer Buffer 1X: 2 lit διαλύματος περιέχουν 12.1 g Tris-Base, 58 g γλυκίνης, 2 g SDS και 400ml μεθανόλης.
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBS 10X: Μετά την παρασκευή του, έγινε ρύθμιση του pH στο 7.4 με την προσθήκη HCl.
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1X: Για την παρασκευή 500 ml διαλύματος αναμίχθηκαν 50 ml TBS 10X με 500 μl Tween-20 και διαλύθηκαν σε 450 ml ddH<sub>2</sub>O.

#### Αντισώματα για ανοσοσύπωμα κατά Western

##### *Πρωτογενή αντισώματα:*

- α-synuclein(C-20)-R: πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την α-συνουκλείνη, sc-7011-R, Santa Cruz Biotechnology
- anti-ACTB: αντίσωμα που αναγνωρίζει την ακτίνη Β, προμηθεύτηκε από την Proteintech (60008)
- GAPDH HRP (60004): αντίσωμα που αναγνωρίζει την GAPDH και είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase). Προμηθεύτηκε από την εταιρεία Proteintech Europe, Manchester, UK.
- Τα anti-CNOT1, anti-CNOT7, and anti-PABP1-R πολυκλωνικά αντισώματα προμηθεύθηκαν Proteintech (14276-1-AP, 14102-1-AP, and 10970-1-AP αντίστοιχα) και το anti-CNOT6-M μονοκλωνικό αντίσωμα (sc-81231) προμηθεύτηκε από την Santa Cruz Biotechnology
- Τα anti-NUDT21 (2203C3), anti-CPSF6 (F-3), anti-CPSF4 (A-11) & anti-WDR33 (D-1) μονοκλωνικά αντισώματα (sc-81109, sc-376228, sc-393316, sc-374466 αντίστοιχα) προμηθεύτηκαν από την Santa Cruz Biotechnology

##### *Δευτερογενή αντισώματα:*

- Anti-rabbit IgG-HRP: αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του κουνελιού (CST#7074), από την εταιρεία Cell Signaling Technologies.
- Anti-mouse IgG-HRP: αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του ποντικιού (CST#7076) από την εταιρεία Cell Signaling Technologies.
- Anti-rabbit: αντίσωμα που είναι συζευγμένο με τη φθορίζουσα χρωστική (Alexa Fluor 488), ThermoFisher Scientific.
- VeriBlot (ab131366): Τα αντιδραστήρια ανίχνευσης VeriBlot για ανοσοκατακρήμιση είναι αντιδραστήρια ανοσοσύπωσης που επιτρέπουν την απρόσκοπτη ανίχνευση των ζωνών των πρωτεϊνών-στόχων που έχουν υποστεί ανοσοσύπωση, χωρίς παρεμβολές από μετουσιωμένη IgG. Αυτό επιτρέπει την ανίχνευση της (συν)ανοσοκατακρημνισμένης

πρωτεΐνης χωρίς να αποκρύπτεται από τις βαριές (50 kDa) και τις ελαφρές αλυσίδες IgG (25 kDa). Προμηθεύτηκε από την εταιρεία Abcam.

Διαλύματα – Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών

- Διάλυμα για τη λύση των κυττάρων : Παρασκευάστηκε διάλυμα PLB (Polysome Lysis Buffer) με 10 mM HEPES pH 7.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40
- Διάλυμα επώασης και έκπλυσης σφαιριδίων: NT2 με υψηλότερη συγκέντρωση σε χλωριούχο νάτριο (NaCl). Παρασκευάστηκε διάλυμα 50 mM TRIS-HCl pH 7.4, 250 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween20.
- Laemmli Buffer 6X: 375 mM Tris pH 6.8, 6% SDS, 40% glycerol, 30% mercaptoethanol, 0.005% bromophenol blue. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους -20 °C.
- Μαγνητικά σφαιρίδια: Magnetic PureProteome™ A/G Mix (Merck/Millipore, Burlington, MA, USA)

Διαλύματα - Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης RNA

- Διάλυμα για τη λύση των κυττάρων ή των ιστών: PLB (Polysome Lysis Buffer), παρασκευάστηκε διάλυμα 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Hepes pH 7.0, 0.5% NP40. Οι αναστολείς για τις RNAσες, τις πρωτεάσες και τις φωσφατάσες, προστέθηκαν ακριβώς πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας.
- Διάλυμα επώασης και έκπλυσης σφαιριδίων: NT2, παρασκευάστηκε διάλυμα 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% NP40.
- Σφαιρίδια Στρεπταβιδίνης: Pierce™ Streptavidin Magnetic Beads, ThermoFisher Scientific.
- Biotin-11-CTP: Roche, Basel, Switzerland.

Διαλύματα-Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην απομόνωση RNA, στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), στην αντίδραση *in vitro* μεταγραφής και στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)

- RNAzol® RT: Πρόκειται για αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για να απομονωθεί το συνολικό RNA από δείγματα ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης, Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA.
- Phenol/Chloroform: Χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του RNA μετά την αντίδραση της *in vitro* μεταγραφής. Προϊόν της Fisher BioReagents, Fair Lawn, NJ, USA.
- Ένζυμο MMLV: Χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής καθώς μπορεί να συνθέτει μόρια DNA με πρότυπο μόρια RNA. Προϊόν της εταιρείας ThermoFisher Scientific.
- Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol, DTT): Διευκολύνει την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής διαλύοντας τους δισουλφορικούς δεσμούς στα RNA, προϊόν της εταιρείας ThermoFisher Scientific.
- RNaseOUT™: Αναστολέας των ενζύμων που έχουν δραστηριότητα ριβονουκλεάσης. Προϊόν της ThermoFisher Scientific.
- Νουκλεοτίδια-Deoxynucleoside Triphosphates, dNTPs: Τριφωσφορικά νουκλεοτίδια ως ισομοριακό μείγμα τεσσάρων νουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dCTP και dGTP), της ThermoFisher Scientific.

- Τυχαία εξαμερή (Random hexamers): Οι εκκινητές αυτοί απαρτίζονται από ένα μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων που έχουν τυχαία νουκλεοτιδική σύσταση. Θεωρείται ότι με τη χρήση του μίγματος των τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών επιτυγχάνεται πληρέστερη κάλυψη όλων των μορίων RNA, από την Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK.
- Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης με  $Mg^{2+}$ : Χρησιμοποιείται προκειμένου να διατηρείται σταθερό το pH της αντίδρασης. Περιέχει επίσης ιόντα  $Mg^{2+}$  που είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της DNA πολυμεράσης. Προϊόν της ThermoFisher Scientific.
- Dream Taq polymerase: DNA πολυμεράση που επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο από την εταιρεία ThermoFisher Scientific.
- SYBR Green: Μη ειδική φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση της ποσοτικής PCR (qPCR), από την εταιρεία Roche.
- T7 RNA polymerase: Χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να γίνει η *in vitro* μεταγραφή του DNA σε RNA. Προϊόν της εταιρείας Takara, Otsu, Japan.
- DNase I: για την αποικοδόμηση του DNA μετά την *in vitro* μεταγραφή, από την New England Biolabs, Connecticut, USA.
- LR clonase II: Χρησιμοποιήθηκε για τον ανασυνδιασμό των pENTR και pAD πλασμιδίων. Προϊόν της ThermoFisher Scientific.

Διαλύματα - Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ενεργότητας πρωτεασώματος

- Διάλυμα για τη λύση των κυττάρων : παρασκευάστηκε διάλυμα 25mM TRIS pH 7.6, 1mM DTT, 2mM ATP, 2mM  $MgCl_2$
- Διάλυμα αντίδρασης: παρασκευάστηκε διάλυμα 5X, 250mM TRIS pH 7.6, 5mM DTT, 10mM ATP, 50mM  $MgCl_2$
- Υπόστρωμα: Suc-LLVY-AMC (φθορίζον πεπτίδιο), από την εταιρεία Enzo Life Sciences

Διαλύματα-Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην *in situ* υβριδοποίηση

- Φθορίζοντες ανιχνευτές, διάλυμα υβριδοποίησης και διάλυμα πλύσης παρέχονται από την εταιρεία Stellaris.
- 4 % PFA σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS: Για την παρασκευή 10ml διαλύματος αναμίχθηκαν 0.4 g PFA, 100μl 1N NaOH και 1ml ddH<sub>2</sub>O και διαλύθηκαν με θέρμανση στους 61°C σε 9ml PBS.
- SlowFade Gold: Χρησιμοποιήθηκε για τη μονιμοποίηση των κυττάρων, προϊόν της εταιρείας Invitrogen

## Μέθοδοι

### Δημιουργία κατασκευών DNA

Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη βρίσκονται στο Παράρτημα.

Τα ανθρώπινα CDS AUF1 (που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη 42kDa), hnRNPA1 SNCA CDS+3'UTRs ενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας την πολυμεράση Phusion (ThermoFisher) από cDNA που παρασκευάστηκε από ολικό RNA προερχόμενο από κύτταρα SK-N-SH. Το προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε μεταξύ των θέσεων περιορισμού KpnI και NotI του πλασμιδίου pENTR-GD, ευγενική δωρεά του Δρ Α.Κλινάκη (IIBEAA). Τα πλασμίδια για AUF1 και hnRNPA1 shRNA παρασκευάστηκαν με τη χρήση του Block-iT U6 RNAi Entry vector Kit (ThermoFisher). Τα προϊόντα PCR SNCA CDS+3'UTR371-2529 εισήχθησαν μεταξύ των θέσεων περιορισμού BamHI και HindIII του πλασμιδίου paaanCAG-pre-mGRASP-mCerulean-2A-nls-mCherry. Η επικύρωση της αλληλουχίας DNA όλων των κατασκευών επιβεβαιώθηκε μέσω αλληλούχισης Sanger από την CeMIA SA (Λάρισα, Ελλάδα). Το πλασμίδιο CNOT1 παραχωρήθηκε ευγενικά από τον Dr. G. Stoecklin<sup>151</sup>.

### Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Η ανάπτυξη κυττάρων έγινε σε κλίβανο επώασης με σταθερή θερμοκρασία 37°C, 5% συγκέντρωση CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία 95%. Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής. Το θρεπτικό ανάπτυξης για τα ανθρώπινα νευροβλαστικά κύτταρα SK-N-SH και για τα ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα HEK293A ήταν DMEM υψηλής συγκέντρωσης σε γλυκόζη συμπληρωμένο με 10% (v/v) ορού εμβρύου βοός και 1% μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κατεχολαμινεργικά κύτταρα μυός CAD αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό DMEM/F12 (μείγμα 1:1) συμπληρωμένο με 8% (v/v) ορού εμβρύου βοός και 1% μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Η διαφοροποίηση των κυττάρων CAD πραγματοποιήθηκε σε DMEM/F12 με 3% ορού εμβρύου βοός και 20μM Forskolin.

### Διαμόλυνση κυττάρων

Για την εισαγωγή εξωγενών νουκλεϊκών οξέων (πλασμίδια, siRNA κτλ) στις κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκε η διαμόλυνση μέσω κατιονικών λιπιδίων και συγκεκριμένα των αντιδραστηρίων JetOptimus για πλασμίδια και JetPrime για siRNA. Η κατάλληλη ποσότητα νουκλεϊκού οξέος σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας αναμιγνύεται με το λιπίδιο σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και επωάζονται για 15 λεπτά ώστε να δημιουργηθούν μικκύλια. Στην αντίδραση προστίθεται εναιώρημα κυττάρων και ακολουθεί επιπλέον αναμονή 10 λεπτών ώστε να πραγματοποιηθεί η διαμόλυνση. Τέλος, προστίθεται θρεπτικό ανάπτυξης και η αντίδραση μεταφέρεται σε πηγάδι για επώαση. Δοκιμαστική διαμόλυνση με πλασμίδιο το οποίο εκφράζει emGFP έδειξε 80% ποσοστό διαμόλυνσης έπειτα από 48 ώρες.

### Απομόνωση RNA

Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιήθηκε 48 ώρες μετά την διαμόλυνση, ξεκινώντας με αφαίρεση του θρεπτικού ανάπτυξης και προσθήκη TRI Reagent, ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και θειοκυανικής γουανιδίνης. Το μείγμα κυττάρων-TRI μεταφέρεται σε σωληνάρια,

υπόκεινται σε έντονη ανάδευση σε αναμείκτη vortex και έπειτα από 5 λεπτά προστίθεται BCP (βρωμοχλωροπροπάνιο) και τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13,000 στροφές ανά λεπτό (rpm) στους 4°C με σκοπό τον διαχωρισμό των φάσεων. Το RNA θα βρίσκεται διαλυμένο στην διάφανη υδατική φάση, το DNA στην λευκή μεσόφαση και οι πρωτεΐνες και λιπίδια στην οργανική φάση. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο στο οποίο προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης. Το νέο μείγμα επώαζεται 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται στις 13,000 στροφές στους 4°C για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το RNA αναμένεται να έχει κατακρημνισθεί και να είναι ορατό ως ημιδιαφανές ιζήμα. Ακολουθούν δύο εκπλήξεις του ιζήματος με 75% αιθανόλη, ξήρανση του ιζήματος και επαναιώρηση σε διπλά απιονισμένο νερό.

#### Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Αρχικά 0.5μg RNA αναμίχθηκαν με 50pmole μίγματος εξαμερών με τυχαία αλληλουχία και 0.5mM μίγματος μονο-δεοξυ-νουκλεοτιδίων (dNTPs) θερμάνθηκαν στους 65°C για 5 λεπτά πριν τοποθετηθούν στον πάγο. Στο δείγμα προστίθεται νέο αντιδραστήριο με 1x ρυθμιστικό διάλυμα, διθειοθρεϊτόλη (DTT, 10mM τελική συγκέντρωση) και αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV με τελικό όγκο 20μL και επώαζεται στους 25°C για 10 λεπτά, στους 37°C για 1 ώρα και στους 85°C για 5 λεπτά.

#### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο -Ποσοτική PCR (qPCR-Real time PCR)

Το προϊόν της αντίστροφης μεταγραφής αραιώθηκε 12 φορές, με τελικό όγκο 240μL από τα οποία 10μL χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ποσοτική αντίδραση, αναμειγμένα με 10μL αντιδραστηρίου με τελικά χαρακτηριστικά 1X ρυθμιστικό διάλυμα, 0.2mM dNTPs, 0.25pmole από κάθε εκκινητή, 1X SybrGreen, και 5 unit της πολυμεράσης DreamTaq. Η αντίδραση αρχικά θερμαίνεται στους 95°C για 5 λεπτά, ακολουθούν 35 κύκλοι 95°C (10 δευτερόλεπτα) και 60°C (30 δευτερόλεπτα) και τελικά παράγεται καμπύλη τήξης του προϊόντος σε εύρος θερμοκρασιών 65-95°C με βήμα 0.5°C. Χρησιμοποιήθηκε ο κυκλοποιητής CFX Opus 96 (Bio-Rad) και το λογισμικό CFX Maestro για την ανάλυση.

#### Δοκιμασία ακτινομυκίνης D

Η ακτινομυκίνη D είναι μη αναστρέψιμος αναστολέας της μεταγραφής, δεσμεύεται στο DNA και δεν επιτρέπει την δράση της RNA πολυμεράσης. Επομένως, ποσοτικοποιώντας τα mRNA ενδιαφέροντος μετά από διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης των κυττάρων στην ακτινομυκίνη D μπορούμε να προσδιορίσουμε τον ρυθμό αποικοδόμησής τους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ορίζοντας τις 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση ως ώρα 0, τα κύτταρα επώαστηκαν με ακτινομυκίνη D (7,5μg/mL) για 3, 6 και 9 ώρες πριν απομονωθεί το ολικό RNA και αναλυθούν τα επίπεδα των mRNA τα οποία μας ενδιαφέρουν με qPCR.

#### Δοκιμασία extension poly(A) test (ePAT)

Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της δοκιμασίας extension poly(A) test (ePAT)<sup>152</sup> με μικρές παραλλαγές. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια παραλλαγή της αντίστροφης μεταγραφής όπου αντί για τυχαίους εκκινητές χρησιμοποιήθηκε ένας εκκινητής 'άγκυρα' ο οποίος περιλαμβάνει 13 θυμίνες και ακολουθία 17 βάσεων η οποία δρα ως αναγνωριστικό του εκκινητή στο στάδιο της



ποσοτικοποίησης. Με αυτό τον τρόπο παράγεται συμπληρωματικό DNA με διαφορετικές αναλογίες πολύ(A) ουράς για κάθε mRNA. Σε 0.5μg RNA προστέθηκε 1 μL εκκινητής 'άγκυρα' με τελικό όγκο 8 μL και το μίγμα επώαστηκε στους 80°C για 5 λεπτά και έπειτα τοποθετήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, όπου προστέθηκε αντίδραση 12 μL η οποία περιέχει 4 μL dH<sub>2</sub>O, 4 μL 5x First strand Buffer, 2 μL 100 mM DTT, 1 μL 10 mM dNTPs, 0.5 μL RNaseOUT και 0.5 μL M-MLV. Το δείγμα επώαστηκε στους 25°C για 10 λεπτά, 37°C για 1 ώρα και 75°C για 15 λεπτά. Έπειτα ενισχύονται οι ισομορφές 3'UTR που επιθυμούμε με ζεύγος βάσεων στο οποίο ο 5'-3' εκκινητής είναι συμπληρωματικός της ακολουθίας η οποία προηγείται της πολύ(A) ουράς σε κάθε ισομορφή και ο 3'-5' εκκινητής είναι συμπληρωματικός της 'άγκυρας' η οποία χρησιμοποιήθηκε πριν. Το προϊόν της αντίδρασης είναι η περιοχή της πολύ(A) ουράς για το συγκεκριμένο μήκος 3'UTR με κατανομή μήκους ουράς αντίστοιχη με το μήκος της ουράς στο mRNA. Για την αντίδραση qPCR, το συμπληρωματικό DNA αραιώθηκε 8 φορές, και 10 μL χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση 20 μL. Η καμπύλη τήξης από την qPCR αναλύθηκε με το πρόγραμμα uMeltQUARTZ, το οποίο υπολογίζει την θεωρητική θερμοκρασία τήξης δεδομένης ακολουθίας. Για τις ισομορφές 3'UTR, βρέθηκε η θερμοκρασία τήξης προϊόντος με 13, 45, 65 και 100 αδενίνες στην πολύ(A) ουρά και συγκρίθηκε με την πραγματική καμπύλη τήξης.

#### Απομόνωση πρωτεϊνών

Για τη λύση των κυττάρων με σκοπό την απομόνωση πρωτεϊνών 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση, αφαιρείται το θρεπτικό ανάπτυξης και προστίθεται το διάλυμα λύσης (25mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100 και 1x αναστολείς πρωτεασών). Το μείγμα μεταφέρετε σε σωληνάριο στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση για 30 λεπτά πριν φυγοκεντρηθεί στις 13.000 rpm στους 4°C για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες, μεταφέρετε σε νέο σωληνάριο, προστίθεται 6x διάλυμα Laemmli και θερμαίνεται για 5 λεπτά στους 100°C πριν την χρήση σε ανοσοσύπωμα κατά Western.

#### Ανοσοσύπωμα κατά Western

Ίσες ποσότητες πρωτεΐνης διαχωρίστηκαν σε 12% ή 15% πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE) υπό αποδιατακτικές συνθήκες πριν μεταφερθούν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπέστη επώαση με 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα TBS με 0.1% Tween-20 για 1 ώρα και επώαστηκε για 16 ώρες στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση με πρωτογενή αντισώματα. Την επόμενη ημέρα, στη μεμβράνη έγιναν 3 πεντάλεπτες πλύσεις με TBST πριν επωαστεί με διάλυμα περιέχον το δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση. Η οπτικοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρήση αντιδραστήριου ECL. Το διάλυμα ECL είναι μίγμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και λουμινόλης που αντιδρά με το ένζυμο υπεροξειδάση του δεύτερου αντισώματος. Η υπεροξειδάση διασπά το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και παράγονται ρίζες O<sub>2</sub>, οι οποίες αντιδρούν με τη λουμινόλη και απελευθερώνουν φωτόνια που προσβάλλουν το φωτογραφικό φιλμ. Η εμφάνιση του φιλμ πραγματοποιήθηκε είτε σε ειδικό μηχάνημα εμφάνισης (Ortimax 2010) σε σκοτεινό θάλαμο είτε με τη χρήση οπτικοποιητή με κάμερα (Vilber Fusion FX). Τα φιλμ πυκνομετρήθηκαν και η ένταση του φωτισμού κάθε πρωτεϊνικής ζώνης αναλύθηκε με το πρόγραμμα ImageJ.

### Ανοσοκατακρήμιση RNA

Η τεχνική της κατακρήμισης RNA μας επιτρέπει να ανιχνεύσουμε μόρια RNA προσδεμένα στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Αρχικά, μαγνητικά σφαιρίδια συζευγμένα με A/G πρωτεΐνες επώαστηκαν 16 ώρες στους 4°C με 2.5 µg anti-AUF1 ή anti-IgG αντίσωμα σε διάλυμα NT2 (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% NP-40) με επιπλέον 1µM DTT, 200U/mL RNaseOUT αναστολέα RNAασών και 5% αλβουμίνης ορού βοοειδών (BSA) υπό συνεχή ανάδευση. Την επόμενη ημέρα, τα σφαιρίδια πλύθηκαν δυο φορές με παγωμένο διάλυμα NT2 και προστέθηκαν σε λύμα από 10<sup>7</sup> SK-N-SH κύτταρα (η απομόνωση πραγματοποιήθηκε επώαζοντας τα κύτταρα με διάλυμα λύσης αποτελούμενο από 10 mM HEPES pH7.0, 100mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 1× cOmplete αναστολείς πρωτεασών και 200U/mL RNaseOUT αναστολέα RNAασών στους 4°C για 30 λεπτά πριν φυγοκεντρηθούν για 10 λεπτά στις 13,000 rpm (το υπερκείμενο αποτελεί το εκχύλισμα). Το μείγμα σφαιριδίων-πρωτεϊνών επώαστηκε υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C για 4 ώρες, εκτός από μια μικρή ποσότητα η οποία σηματοδοτεί την αρχική κατάσταση. Τα σφαιρίδια πλένονται τρεις φορές με διάλυμα NT2 ώστε να αφαιρεθούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις RNA/πρωτεϊνών. Τέλος υπόκεινται σε ζύμωση με πρωτεΐνάση K στους 55°C για 20 λεπτά, και προσθήκη Tri Reagent ώστε να απομονωθεί το RNA.

### Έλεγχος συγγένειας ριβοσώματος με το mRNA

Η παρούσα τεχνική αποτελεί παραλλαγή της ανοσοκατακρήμισης RNA. Κύτταρα SK-N-SH διαμολύνθηκαν με πλασμίδια με σκοπό την υπερέκφραση ή αποσιώπηση των υπό μελέτη πρωτεϊνών ταυτόχρονα με πλασμίδιο το οποίο εκφράζει την πρωτεΐνη της 60S υπομονάδας του ριβοσώματος RPL22 με ένα επιπρόσθετο οκταπεπτίδιο ονομαζόμενο FLAG. Ο συγκεκριμένος επίτοπος μπορεί να λειτουργήσει ως 'ετικέτα' η οποία αναγνωρίζεται από αντισώματα. Δύο ημέρες μετά τη διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση RNA με σφαιρίδια ρητίνης προσδεμένα με αντί-FLAG αντίσωμα. Στο εκχύλισμα RNA πραγματοποιήθηκε qPCR για την εκτίμηση της ποσότητας mRNA της α-συνουκλείνης με βραχύ ή μακρύ 3'UTR προσδεμένες στο ριβόσωμα.

### Συν-ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών

Δυο ημέρες μετά την διαμόλυνση SK-N-SH κυττάρων με πλασμίδιο το οποίο εκφράζει CNOT1, 10<sup>7</sup> κύτταρα υπέστην λύση με διάλυμα λύσης αποτελούμενο από 10 mM HEPES pH7.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 1× cOmplete αναστολείς πρωτεασών και 40U/mL RNaseOUT αναστολέα RNAασών στους 4°C για 30 λεπτά πριν φυγοκεντρηθούν για 15 λεπτά στις 13,000 rpm. Το υπερκείμενο αναμίχθηκε με 2 µg αντί-CNOT1 ή αντί-IgG αντίσωμα και επώαστηκε 16 ώρες σε θερμοκρασία 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Την επόμενη ημέρα προετοιμάστηκαν μαγνητικά σφαιρίδια συζευγμένα με A/G πρωτεΐνες πραγματοποιώντας τρεις πλύσεις με παγωμένο PBS με 0.1% Tween-20 και επώαζοντας τα με διάλυμα PBS με 2% αλβουμίνης ορού βοοειδών (BSA) και 0.1% Tween-20. Έπειτα τα σφαιρίδια πλύθηκαν 3 ακόμα φορές με παγωμένο PBS και εξισορροπήθηκαν με διάλυμα NT2 (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% NP-40) πριν προστεθούν στο μίγμα κυτταρικού εκχυλίσματος / αντισωμάτων και τεθούν σε ρότορα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, τα σφαιρίδια πλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα NT2 και οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν προσθέτοντας στα σφαιρίδια 100µL NT2 συμπληρωμένο με 1× διάλυμα Laemmli, και επώαζοντας τα στους 100°C για 15 λεπτά.

### Κατακρήμιση πρωτεϊνών με βιοτινυλιωμένο RNA

Με χρήση PCR πολλαπλασιάστηκαν διαφορετικά τμήματα συμπληρωματικού DNA από το ώριμο mRNA της συνουκλεΐνης (5'UTR, CDS, 3'UTR570, and 3'UTR2550). Σε κάθε περίπτωση ο εμπρόσθιος εκκινήτης περιείχε και ακολουθία υποκινητή T7 RNA πολυμεράσης 5'-AGTAATACACTCACTATAGGG-3'. Για την *in vitro* μεταγραφή μια αντίδραση 20μL περιέχουσα 0.75μg cDNA, 1× T7 buffer, 2μL 50mM DTT, 0.5μL αναστολέα RNAασών (RNAaseOUT, ThermoFisher), 2μL (20 mM A/U/G, 16.3 mM C, 3.7 mM biotin-11-CTP, Roche) NTPs, 1μL T7 RNA πολυμεράση (Takara Bio, Kusatsu, Japan) επώαστηκε στους 42°C για 2 ώρες. Το cDNA αφαιρέθηκε με χρήση DNAασης I (NEB) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C και το RNA-ανιχνευτής απομονώθηκε με κατακρήμιση με LiCl και προετοιμάστηκε προσθέτοντας 2μg ανιχνευτή σε 100μL διαλύματος (10mM Tris pH7.0, 0.1M KCl, και 10mM MgCl<sub>2</sub>), θερμαίνοντας το μίγμα στους 90°C για 2 λεπτά, τοποθετώντας το στον πάγο για 2 λεπτά και αφήνοντάς το σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά ώστε να δημιουργηθεί η σωστή δευτεροταγής δομή.

Για την κατακρήμιση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ένας εγκέφαλος μυός μεταγεννητικής ημέρα 3 ή 10<sup>7</sup> κύτταρα SK-N-SH για κάθε συνθήκη αναλόγως το πείραμα. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν με παγωμένο PBS πριν επαναιωρηθούν σε 350μL διαλύματος NT2 (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05%NP-40 και 1X αναστολείς πρωτεασών). Το μίγμα επώαστηκε για 45 λεπτά στους 4°C υπο συνεχή ανάδευση, φυγοκεντρήθηκε στα 13,000 rpm για 10 λεπτά και το υπερκείμενο αναμίχθηκε με το διάλυμα ανιχνευτή και τοποθετήθηκαν σε συνεχή ανάδευση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, προστέθηκαν 50μL μαγνητικών σφαιριδίων στρεπταβιδίνης (η στρεπταβιδίνη παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με τη βιοτίνη του ανιχνευτή) και επαναλήφθηκε η δίωρη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Τέλος, τα σφαιρίδια πλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα NT2 ώστε να αφαιρεθούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις πριν προστεθεί μίγμα NT2 με 1× διάλυμα Laemmli, και επωαστούν στους 100°C για 15 λεπτά ώστε να απελευθερωθούν οι δεσμευμένες πρωτεΐνες.

### Κυτταρική κλασματοποίηση

Η αρχή της κυτταρικής κλασματοποίησης είναι να χρησιμοποιηθούν ήπιες συνθήκες λύσης ώστε να καταστραφεί η πλασματική μεμβράνη αφήνοντας ακέραια την πυρηνική. Προς αυτό, τα κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα υποτονικής λύσης (hypotonic lysis buffer, HLB) (10 mM Tris pH 7.4, 10mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 0.1% NP40 και αναστολέα RNAασών (RNAaseOUT, Invitrogen)) για 10 λεπτά στην πάγο πριν φυγοκεντρηθούν στις 2.500 στροφές στους 4°C για 3 λεπτά. Το υπερκείμενο περιέχει το κυτταροπλασματικό κλάσμα και το ίζημα το πυρηνικό κλάσμα, στα οποία προστίθεται TRI Reagent. Κατά τη διαδικασία της απομόνωσης ολικού RNA είναι σημαντικό να επωαστούν τα δείγματα στους 65°C για 10 λεπτά πριν το βήμα διαχωρισμού των φάσεων ώστε να ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός των mRNA από το πυρηνικό φάκελο.

### *In situ* υβριδοποίηση RNA ταυτόχρονα με ανοσοκυτταροχημεία

Η σήμανση του mRNA της συνουκλεΐνης με φθορίζοντες ανιχνευτές πραγματοποιήθηκε με το προϊόν Stellaris. Τα κύτταρα, προσδεδμεμένα σε καλυπτρίδες όπως στη ανοσοκυτταροχημεία, πλύθηκαν μια φορά με PBS, μονιμοποιήθηκαν με 4% παραφορμαλδεΐδη σε PBS για 15 λεπτά, πλύθηκαν δυο ακόμη φορές με PBS και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 70% αιθανόλης σε νερό στους 4°C για μία ημέρα ώστε να διατηρηθεί η μεμβράνη. Σε επόμενο στάδιο, αφαιρέθηκε η αιθανόλη, ακολούθησε πλύση με διάλυμα πλύσης A (παρέχεται από την εταιρία) και επώαση 8 ωρών στους 37°C με διάλυμα υβριδοποίησης (παρέχεται από την εταιρία) το οποίο περιέχει: ανιχνευτές για το 3'UTR της συνουκλεΐνης (παράχθηκαν 30 ακολουθίες κατά μήκους του 3'UTR του mRNA της συνουκλεΐνης συζευγμένες με φθοροφόρο (Quasar™ 570nm) σε αναλογία 1:100 και πρωτογενές

αντίσωμα αντί-συνουκλεΐνης σε αναλογία 1:250. Οι καλυπτρίδες πλύθηκαν δυο φορές με διάλυμα πλύσης A και ακολούθησε επώαση με διάλυμα πλύσης A περιέχον φθορίζον δευτερογενές αντίσωμα (Alexa Fluor™ 488nm) σε αναλογία 1:500 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, επιπλέον επώαση με πυρηνική χρώση DAPI για 3 λεπτά, μια τελευταία πλύση με διάλυμα πλύσης B (παρέχεται από την εταιρία) και μονιμοποίηση σε αντικειμενοφόρο με χρήση του μέσου SlowFade Gold (Invitrogen).

#### Δοκιμασία πουρομυκίνης (SUNSET)

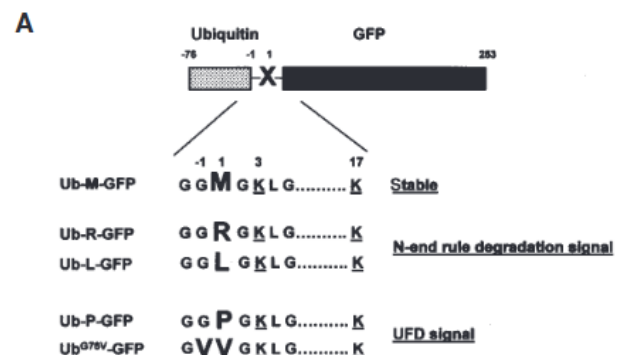
Η δοκιμασία SURface SEnsing of Translation (SUnSET) βασίζεται στο μηχανισμό δράσης του αντιβιοτικού πουρομυκίνη. Σε κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί διαμόλυνση με πλασμίδια ενδιαφέροντος για 48 ώρες προστίθεται πουρομυκίνη με τελική συγκέντρωση 7μg/mL 30 λεπτά πριν τη συλλογή. Η πουρομυκίνη προσδένεται στο καρβοξυτελικό άκρο της υπό μετάφρασης αμινοξικής αλυσίδας και την αποδεσμεύει από το ριβόσωμα. Η χρήση αντισώματος αντί-πουρομυκίνης κατά το ανοσοσύτρωμα Western επιτρέπει την οπτικοποίηση του συνόλου της μετάφρασης η οποία συντελείται στο κύτταρο.

#### Δοκιμασία DRB

Η δοκιμασία DRB βασίζεται στον αναστρέψιμο αναστολέα της μετάφρασης 5,6-Διχλωρο-1-β-D-ριβοφουρανοσυλβενζιμιδαζολη (DRB) ώστε να συγκριθεί η ταχύτητα μεταγραφής μεταξύ δειγμάτων. Σε κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί διαμόλυνση με πλασμίδια ενδιαφέροντος για 48 ώρες προστίθεται DRB με τελική συγκέντρωση 100μM για 2 ώρες ώστε να πραγματοποιηθεί παύση της μεταγραφής. Μετά το πέρας των δύο ωρών τα κύτταρα εκτίθενται σε θρεπτικό άνευ DRB για 5, 10, 15, 30 ή 45 λεπτά και έπειτα συλλέγονται με Tri Reagent ώστε να απομονωθεί το ολικό RNA. Πραγματοποιείται αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής και με χρήση qPCR μετρούνται τα επίπεδα των ιντρονίων της α-συνουκλεΐνης.

#### Ανάλυση αναστολής πρωτεασώματος

Χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια τα οποία παράγουν χίμαιρες ουβικουτίνης-GFP με παραλλαγές στην αμινοξική ακολουθία του συνδέτη<sup>148</sup>. Το ub-M-GFP, χρησιμοποιείται ως πλασμίδιο ελέγχου καθώς η μεθειωνίνη στη θέση 1 του συνδέτη του προσδίδει σταθερότητα σύμφωνα με το μοντέλο αποικοδόμησης βάσει του αμινοτελικού άκρου. Εν αντιθέσει, το ub-R-GFP αναμένεται να υπόκεινται σε έντονη αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα και τέλος το ub-G76V-GFP περιέχει επαναλαμβανόμενες βαλίνες στις θέσεις -1 και 1 του συνδέτη οι οποίες αποτρέπουν την αποκόλληση της ουβικουτίνης από το GFP. Η αδυναμία υδρόλυσης αποτελεί σηματοδότηση για αποικοδόμηση μέσα από το μονοπάτι προσδεδωμένης ουβικουτίνης (Ubiquitin-fusion degradation pathway). Οπτικοποίηση και ποσοτικοποίηση των τετμημένων τμημάτων (X-GFP) και μετά κανονικοποίηση με βάση το ub-M-GFP δηλώνει την σχετική αναστολή του πρωτεασώματος.



### Προσδιορισμός της ενεργότητας του πρωτεασώματος

Η μέθοδος της ενεργότητας πρωτεασώματος χρησιμοποιείται για τον *in vitro* προσδιορισμό της ενεργότητας χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος. Το πεπτίδιο Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-άμιδο-4-μεθυλοκουμαρίνη (Suc-LLVY-AMC) αποτελεί το υπόστρωμα για το 20S πρωτεάσωμα (υπομονάδα β5), τις καλπαΐνες και άλλες πρωτεάσες που μοιάζουν με τη χυμοθρυψίνη. Το μη φθορίζον υπόστρωμα παράγει ένα φωτεινό μπλε φθορίζον προϊόν όταν διασπαστεί το πεπτίδιο και απελευθερωθεί το φθοροφόρο AMC το οποίο έχει φάσμα εκπομπής που μπορεί εύκολα να ανιχνευθεί με το σετ φίλτρων DAPI. Μετά τη διαδικασία επιμόλυνσης των κυττάρων και επώασης με 0.6μM εποξιομυκίνη (ως θετικός μάρτυρας ελέγχου), πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων στο διάλυμα που παρασκευάστηκε με ηχοβολισμό 3x5 δευτερολέπτων (εύρους 60% και με ενδιάμεσες παύσεις 10 δευτερολέπτων) στους 4°C. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση των κυτταρικών μεμβρανών με φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 στροφές/λεπτό. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης επώαστηκε με το διάλυμα αντίδρασης (Reaction Buffer) σε μία αντίδραση τελικού όγκου 100μl, για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C. Για τον τερματισμό της αντίδρασης προστέθηκε 5% SDS. Το ποσό του διασπασμένου τμήματος AMC ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον αναλυτή μικροπλακιδίων Tecan Spark με διέγερση (EX) 380/εκπομπή (EM) 460.

### Πλασμιδιακά συστήματα ελέγχου αυτοφαγικής ροής

Η LC3 διασπάται ταχέως μετά τη σύνθεσή της από την ATG4 αφήνοντας μια καρβοξυτελική γλυκίνη. Το μόριο LC3-I που σχηματίζεται με αυτόν τον τρόπο βρίσκεται διάχυτο στο κυτταρόπλασμα, αλλά κατά την επαγωγή της αυτοφαγίας, η LC3-I μετατρέπεται σε LC3-II με τη σύζευξη της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE) στο C-τελικό άκρο. Αυτό το λιπίδιο χρησιμεύει ως άγκυρα που μεσολαβεί στη σύνδεση της LC3-II με το φαγοφόρο (phagophore) καθώς και με την εσωτερική και εξωτερική αυτοφαγοσωμική μεμβράνη. Μετά τη συγχώνευση με τα λυσοσώματα, η LC3-II στην εσωτερική μεμβράνη αποικοδομείται, ενώ η LC3-II στην εξωτερική μεμβράνη απολιπιδοποιείται και ανακυκλώνεται<sup>153</sup>.

Στο πλασμίδιο DsRed-LC3-GFP<sup>149</sup>, οι φθορίζουσες πρωτεΐνες DsRed και GFP είναι συζευγμένες με την LC3 με τρόπο ώστε η DsRed να συνδέεται με το αμινοτελικό άκρο LC3 και η GFP με το καρβοξυτελικό. Έπειτα από την διάσπαση της LC3 στο καρβοξυτελικό από την ATG4 ισομοριακά σε DsRed-LC3 και GFP, το DsRed-LC3 ενσωματώνεται στα αυτοφαγοσώματα και μπορεί να χρησιμεύσει ως εσωτερικός έλεγχος φόρτωσης, ενώ το GFP αποικοδομείται από την αυτοφαγία. Η αναλογία φθορισμού GFP/ DsRed μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αυτοφαγίας. Διαμόλυνση με πλασμίδιο παράγων DsRed-LC3-GFP σε κύτταρα SK-N-SH για 48 ώρες ακολουθείται από φθορομέτρηση. Ο λόγος GFP προς DsRed-LC3 αποτελεί δείκτη αυτοφαγίας, με άνοδό του να περιγράφει αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας.

Στο δεύτερο πλασμιδιακό σύστημα, χρησιμοποιούνται δύο διαμολυσμένοι κυτταρικοί πληθυσμοί<sup>150</sup>. Η λουσιφεράση Renilla βρίσκεται συνδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο της LC3 είτε με την αγρίου τύπου γλυκίνη στο εκτεθειμένο καρβοξυτελικό άκρο (πειραματικός πληθυσμός LC3.wt) είτε με υποκατάσταση αδενίνης στην ίδια θέση (πληθυσμός ελέγχου LC3.G120A), μετάλλαξη η οποία δεν επιτρέπει την προθήκη φωσφατιδυλαιθανολαμίνης με αποτέλεσμα την μη πρόσδεση της LC3 στα αυτοφαγοσώματα. Κύτταρα SK-N-SH διαμολύνονται με τα παραπάνω πλασμίδια για 48 ώρες, μετά το πέρας των οποίων τελείται μέτρηση χημειοφωταύγειας ώστε να

ποσοτικοποιηθεί δραστικότητα της Renilla-LC3. Ο λόγος LC3.wt/LC3G120A χρησιμεύει ως δείκτης της αυτοφαγικής δραστηριότητας, με άνοδό του να αντιστοιχεί σε αναστολή της.

#### Στατιστική επεξεργασία

Όλες οι τιμές των αποτελεσμάτων συνιστούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο εκάστοτε δείγμα και το δείγμα μάρτυρα προσδιορίστηκαν με εφαρμογή του Student's t-test (όταν συγκρίνονταν 2 ομάδες αποτελεσμάτων). Η σύγκριση μεταξύ πολλαπλών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε – όπου ήταν απαραίτητη – με τη βοήθεια της μεθόδου ελέγχου διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's test ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, ως στατιστικά σημαντικές κρίθηκαν οι τιμές για τις οποίες ισχύει:  $p < 0.05$ . Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 8.

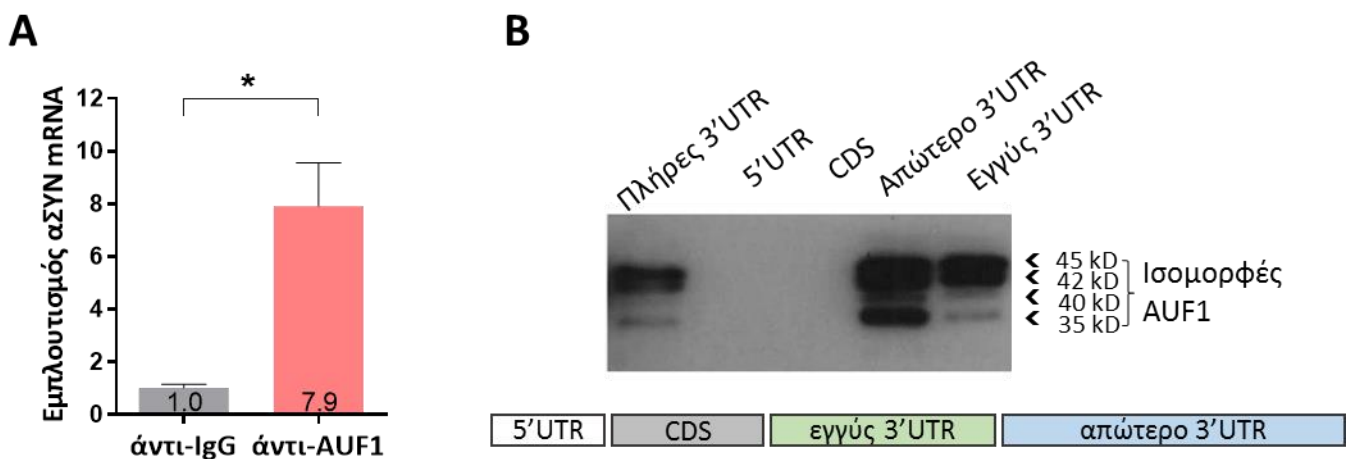
# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

## 1.AUF1

### 1.1 Η AUF1 προσδένεται στο 3' αμετάφραστο άκρο του mRNA της α-συνουκλεΐνης

Αρχικά, με σκοπό την επαλήθευση του ευρήματος συγγένειας AUF1-α-συνουκλεΐνης από την πρωτεωμική ανάλυση, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση RNA (RNA-IP) σε νευροβλαστικά κύτταρα SK-N-SH. Το κατακρημισμένο mRNA με χρήση αντί-AUF1 αντισώματος και αντί-IgG για συνθήκη ελέγχου ελέγχθηκε με RT-qPCR προς μέτρηση των σχετικών επιπέδων mRNA της α-συνουκλεΐνης. Το mRNA της α-συνουκλεΐνης βρέθηκε εμπλουτισμένο στα αντί-AUF1 δείγματα συγκριτικά με τα αντί-IgG δείγματα (Εικόνα 1A), υποστηρίζοντας έτσι την παρατήρηση της πρωτεωμικής ανάλυσης.

Δεδομένου πως στην πρωτεωμική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής το αμετάφραστο άκρο (3' untranslated region ή 3'UTR) του mRNA της συνουκλεΐνης, διερευνήθηκε η πιθανότητα πρόσδεσης της AUF1 σε άλλα τμήματα του mRNA. Παράχθηκαν ανιχνευτές-τμήματα βιοτινυλωμένου RNA τα οποία αντιστοιχούν σε περιοχές του mRNA της α-συνουκλεΐνης (5' αμετάφραστο άκρο ή 5'UTR, κωδικεύουσα περιοχή ή CDS, εγγύς 3'UTR έως τις πρώτες 560 βάσεις αυτού, απώτερο 3'UTR από την 600ή έως την 2520ή βάση του και τέλος ολόκληρο το 3'UTR). Οι ανιχνευτές επώαστηκαν αρχικά με εκχύλισμα ανθρώπινων νευροβλαστικών κυττάρων SK-N-SH και έπειτα με μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης. Η συγγένεια βιοτίνης-στρεπταβιδίνης οδηγεί στην συγκράτηση του ανιχνευτή στα σφαιρίδια, μαζί με πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται σε αυτόν. Το προϊόν αναλύθηκε σε ανοσοσύτωμα κατά Western με αντίσωμα αντί-AUF1 (Εικ.1B). Βρέθηκε πως η AUF1 έχει συγγένεια με το 3'UTR, με εντονότερη παρουσία στο άπω 3'UTR χωρίς να συνδέεται στο 5'UTR ή την κωδικεύουσα περιοχή.



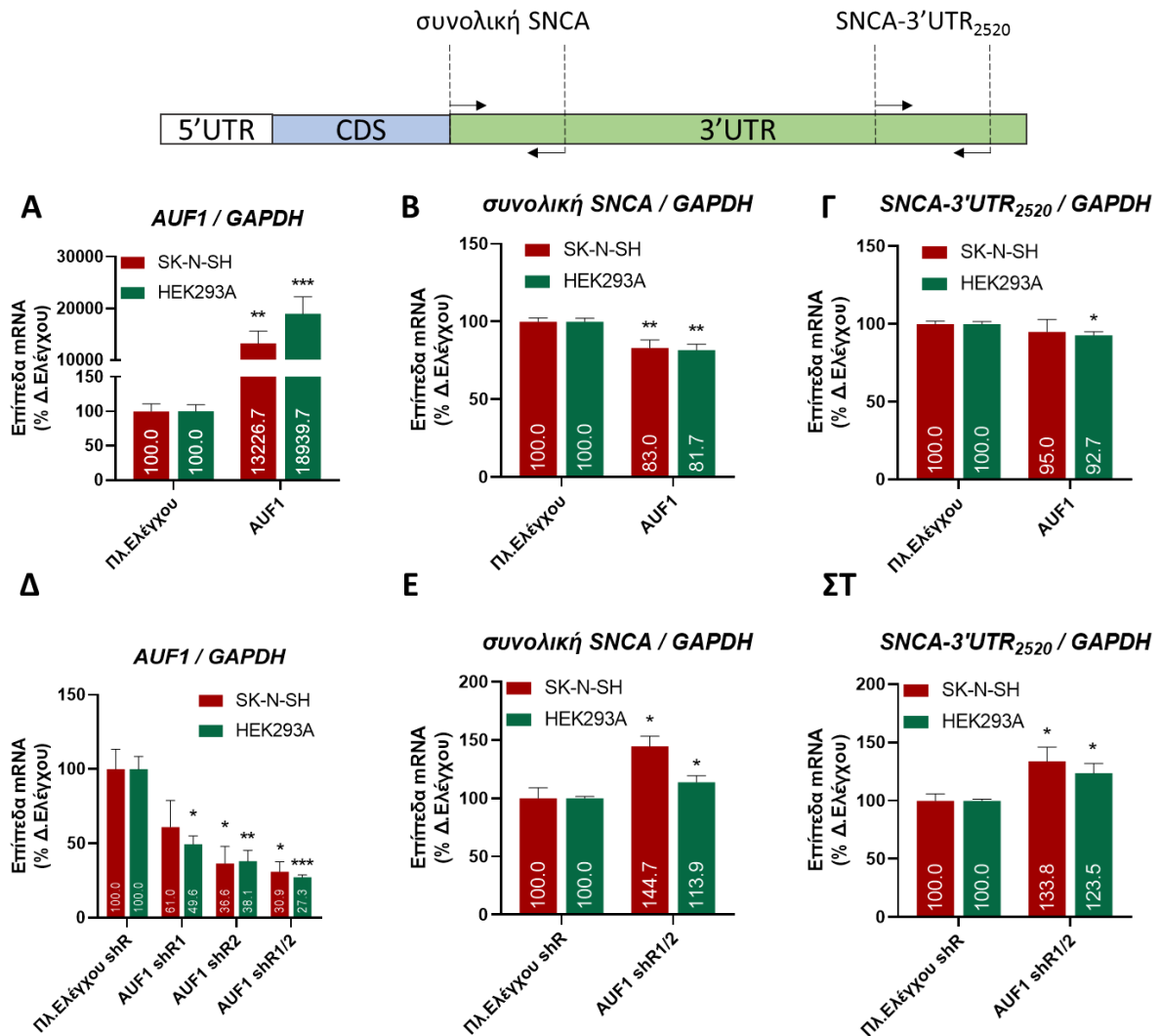
**Εικόνα 1.** Η AUF1 προσδένεται στο 3'UTR της α-συνουκλεΐνης. **A.** Ανοσοκατακρήμιση RNA σε νευροβλαστικά κύτταρα SK-N-SH **B.** Κατακρήμιση πρωτεϊνών εκχυλίσματος κυττάρων SK-N-SH με βιοτινυλωμένους ανιχνευτές για τις λειτουργικές και ρυθμιστικές περιοχές του mRNA της α-συνουκλεΐνης. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=3, Student's t-test ( $*\leq 0.05$ ).



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1.2 Η υπερέκφραση AUF1 μειώνει τα επίπεδα mRNA συνουκλεΐνης

Η πρόσδεση της AUF1 στο 3'UTR του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης μας οδηγεί στο ερώτημα του αποτελέσματος της αλληλεπίδρασης αυτής. Βιβλιογραφικά η AUF1 έχει κυρίως συνδεθεί με αποσταθεροποίηση mRNA<sup>154</sup>. Για την διερεύνηση τούτου πραγματοποιήσαμε διαμόλυνση κυττάρων SK-N-SH, όπως και αθανατοποιημένων επιθηλιακών νεφρικών κυττάρων HEK293A με πλασμίδια τα οποία είτε υπερεκφράζουν AUF1 είτε το αποσιωπούν παράγοντας shRNA για αυτό. Έπειτα από 48 ώρες απομονώθηκε το RNA, παράχθηκε cDNA και ελέγχθηκαν τα επίπεδα του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης με RT-qPCR. Καθώς είδαμε διαφορετική συγγένεια της AUF1 κατά το μήκος του 3'UTR, υπάρχει περίπτωση να επηρεάζει σε διαφορετικό βαθμό τις ισομορφές της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης του. Για να εξεταστεί αυτό, χρησιμοποιήθηκαν δυο σετ εκκινήτων: το πρώτο ενισχύει τις πρώτες 75 βάσεις του 3'UTR και συμβολίζει το σύνολο των ισομορφών καθώς οι βάσεις αυτές είναι κοινές. Το δεύτερο ενισχύει το τμήμα βάσεων 2101-2208 και αντιστοιχεί την ισομορφή με μήκος 2520, η δεύτερη πιο κοινή σύμφωνα με πειράματα Northern<sup>28</sup>. Τα πλασμίδια ήταν αποτελεσματικά στο να μεταβάλλουν τα επίπεδα του mRNA της AUF1 (Εικ.2Α,Δ). Και στις δυο κυτταρικές σειρές η υπερέκφραση της AUF1 επέφερε μείωση των συνολικών επιπέδων του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε σύγκριση με το δείγμα (Εικ.2Β) και η αποσιώπηση του AUF1 οδήγησε στο αντίθετο αποτέλεσμα (Εικ.2Ε). Όσον αφορά τη μεγάλη ισομορφή του 3'UTR, η υπερέκφραση AUF1 επέφερε οριακή μείωση επίπεδο των συγκεκριμένων mRNA στα HEK293A κύτταρα (Εικ.2Γ), ενώ η αποσιώπηση AUF1 αύξησε την παρουσία SNCA mRNA και στις δυο κυτταρικές σειρές (Εικ.2ΣΤ).

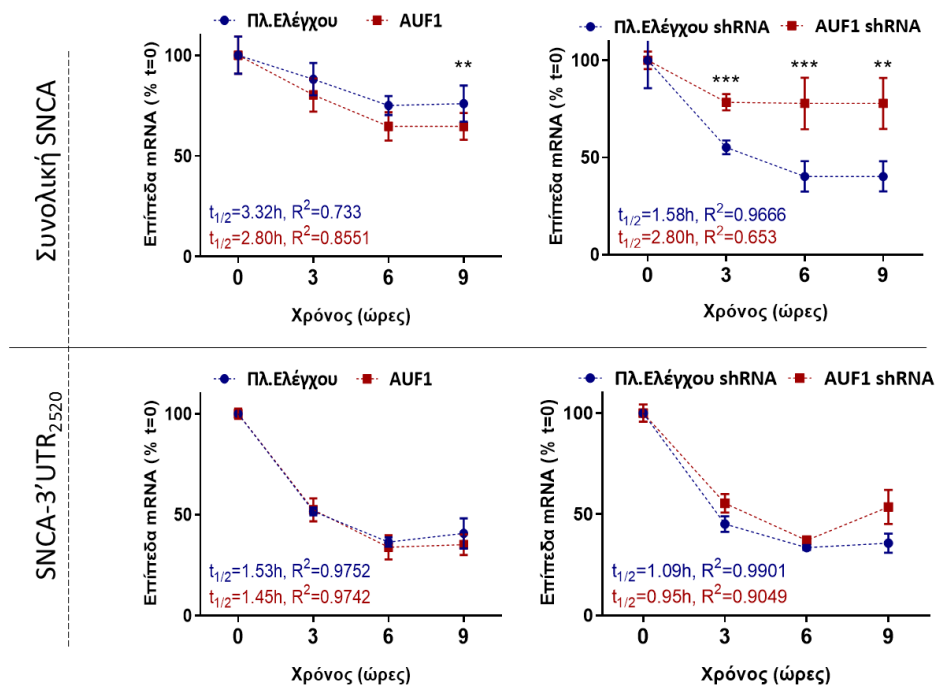


**Εικόνα 2. Η επίδραση της AUF1 στα επίπεδα του mRNA της α-συνουκλεΐνης.** Υπερέκφραση και αποσιώπηση της AUF1 σε κύτταρα SK-N-SH μέσω διαμόλυνσης για 48 ώρες πριν την απομόνωση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA. **A, Δ.** Μέτρηση επιπέδων AUF1 mRNA προς έλεγχο της ποιότητας διαμόλυνσης. Επίπεδα συνολικού (**B**) και 3'UTR<sub>2520</sub> (**Γ**) mRNA α-συνουκλεΐνης με ταυτόχρονη υπερέκφραση AUF1. Επίπεδα συνολικού (**E**) και 3'UTR<sub>2520</sub> (**ΣΤ**) mRNA α-συνουκλεΐνης μετά από αποσιώπηση AUF1. Μέσος όρος ±SD, n=13 & 6 για SK-N-SH & HEK293A αντίστοιχα, (**A-Γ, E-ΣΤ**) Student's t-test, (**Δ**) one-way ANOVA, F=27.34 & 7.038 για SK-N-SH & HEK293A αντίστοιχα, Tukey's test για της επιμέρους συγκρίσεις (\*≤0.05, \*\*≤0.01, \*\*\*≤0.001).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1.3 Η AUF1 επηρεάζει την σταθερότητα του mRNA της $\alpha$ -συνουκλεΐνης

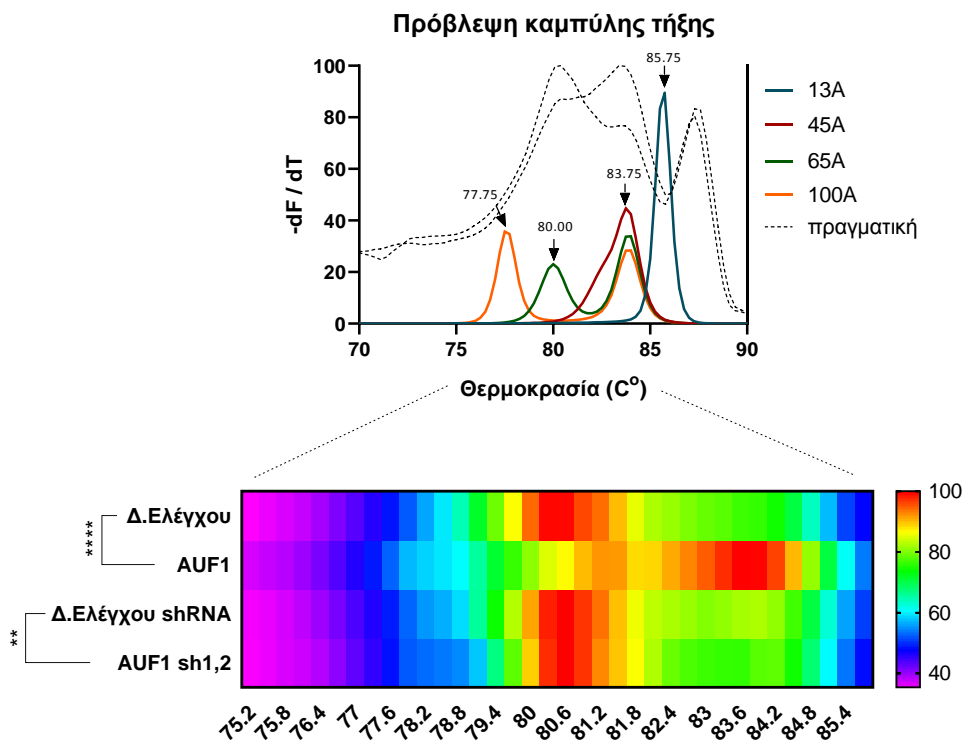
Δεδομένου πως η AUF1 έχει συνδεθεί με την αποσταθεροποίηση των mRNA στόχων της μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης ή αποσιώπησής της στη σταθερότητα του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Σε κύτταρα SK-N-SH πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με σκοπό την υπερέκφραση ή αποσιώπηση της AUF1. Έπειτα από 48 ώρες προστέθηκε στο θρεπτικό ανάπτυξης ο μη αντιστρεπτός αναστολέας της μεταγραφής ακτινομυκίνη D και συλλέχθηκαν κύτταρα πριν την επώαση και έπειτα από 3,6 ή 9 ώρες επώασης. Καθώς έχει διακοπεί η μεταγραφή, εάν ποσοτικοποιήσουμε τα mRNA ενδιαφέροντος (έπειτα από απομόνωση RNA των δειγμάτων, αντίστροφη μεταγραφή και RT-qPCR) μπορούμε να οπτικοποιήσουμε το ρυθμό καταστροφής των mRNA τα οποία υπήρχαν στο κύτταρο πριν προσθέσουμε τον αναστολέα. Ελέγξαμε τόσο το συνολικό mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης όσο και την μεγάλη ισομορφή 3'UTR<sub>2520</sub>. Η υπερέκφραση της AUF1 αποσταθεροποίησε το συνολικό mRNA συναρτήσει του χρόνου και η αποσιώπηση της AUF1 επέφερε σταθεροποίηση (Εικόνα 3, πάνω). Ο ρυθμός καταστροφής της μεγάλης ισομορφής 3'UTR έμεινε ανεπηρέαστος της διακύμανσης επιπέδων της AUF1 (Εικ.3, κάτω). Συνεπάγεται επομένως πως η μειωμένη σταθερότητα η οποία παρατηρήθηκε στο συνολικό των ισομορφών οφείλεται σε



αποσταθεροποίηση των βραχέων ισομορφών.

**Εικόνα 3. Η AUF1 επηρεάζει την σταθερότητα του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης.** Για τη μέτρηση τα της σταθερότητας του συνολικού (A,B) και 3'UTR<sub>2520</sub> (Γ,Δ) SNCA mRNA πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση (αριστερά) ή αποσιώπηση (δεξιά) της AUF1 σε κύτταρα SK-N-SH μέσω διαμόλυνσης για 48 ώρες πριν την επώαση με ακτινομυκίνη D για 0,3,6 ή 9 ώρες. Τα επίπεδα mRNA ποσοτικοποιήθηκαν με RT-qPCR. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=5, μη γραμμική παλινδρόμηση (one phase decay,  $\gamma_0=100$ ), Student's t-test για τις επιμέρους συγκρίσεις (\*\* $\leq 0.01$ , \*\*\* $\leq 0.001$ ).

1.4 Η AUF1 επηρεάζει το μήκος της πολύ(A) ουράς του mRNA της α-συνουκλείνης. Έχει υποτεθεί πως η αποσταθεροποιητική δράση της AUF1 σε πολλές περιπτώσεις συντελείται μέσα από τη στρατολόγηση ή/και σταθεροποίηση του συμπλόκου αποαδενυλασών CNOT1-CCR4-CNOT7 στην πολύ(A) ουρά και πιθανόν ο εκτοπισμός της PABPC1, πρωτεΐνης η οποία προσδένεται στις αδενίνες της πολύ(A) ουράς και αποτρέπει την δράση των νουκλεασών. Για να ελεγχθεί η πιθανότητα επίδρασης της AUF1 στην πολύ(A) ουρά των διαφόρων εκδοχών 3'UTR συνουκλείνης πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία extension Poly(A) Test ή ePAT. Εν συντομία, σε κύτταρα SK-N-SH τα οποία υπερεκφράζουν ή αποσιωπούν την AUF1 (μέσω διαμόλυνσης και αναμονής 48 ωρών) απομονώθηκε το RNA και πραγματοποιήθηκε παραλλαγή της αντίστροφης μεταγραφής η οποία παράγει συμπληρωματικό DNA με διαφορετικές αναλογίες πολύ(A) ουράς για κάθε mRNA. Έπειτα ενισχύεται το 3' άκρο ταυτόχρονα με την πολύ(A) ουρά για κάθε επιθυμητή θέση πολυαδενυλίωσης. Το προϊόν της αντίδρασης είναι η περιοχή της πολύ(A) ουράς για το συγκεκριμένο μήκος 3'UTR με κατανομή μήκους ουράς αντίστοιχη με το μήκος της ουράς στο mRNA. Οι κατανομές αναλύθηκαν συγκρίνοντας τις καμπύλες τήξης των προϊόντων με καμπύλες παραχθείσες από το πρόγραμμα uMeltQUARTZ, το οποίο υπολογίζει την θεωρητική θερμοκρασία τήξης δεδομένης ακολουθίας. Για τις ισομορφές 3'UTR, βρέθηκε η θερμοκρασία τήξης προϊόντος με 13, 45, 65 και 100 αδενίνες στην πολύ(A) ουρά και συγκρίθηκε με την πραγματική καμπύλη τήξης (Εικόνα 4). Η υπερέκφραση AUF1 οδήγησε στην μετατόπιση της υψηλότερης κορυφής από θερμοκρασία η οποία αντιστοιχεί σε 65A σε θερμοκρασία η οποία αντιστοιχεί σε 45A στο βραχύτερο 3'UTR (290 βάσεις). Η αποσιώπηση AUF1 οδήγησε στο αντίστροφο, μειώνοντας το ύψος της κορυφής αντίστοιχης των 45A. Η κατανομή μήκους πολύ(A) ουράς του 3'UTR<sub>2520</sub> δεν μεταβλήθηκε σημαντικά με τη μεταβολή των επιπέδων της AUF1.

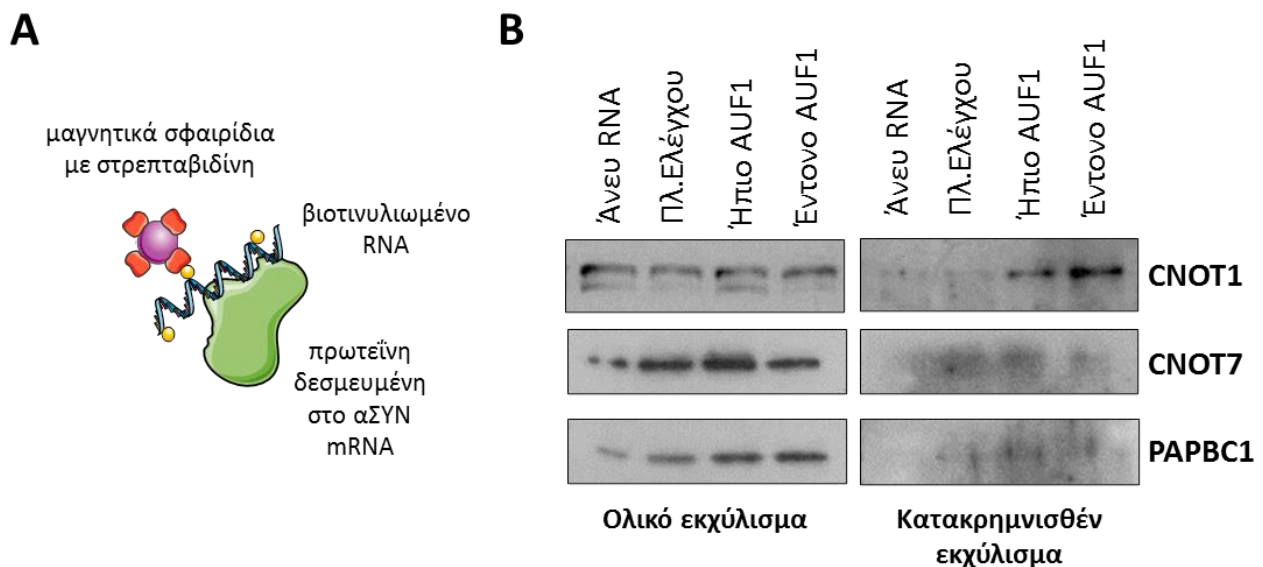


**Εικόνα 4.** Η AUF1 μειώνει το μήκος της πολύ(A) ουράς του mRNA της α-συνουκλείνης. Προσομοίωση καμπύλης τήξης των προϊόντων SNCA RT-qPCR με 13, 45, 65 ή 100 κατάλοιπα αδενοσίνης, όπως προβλέπεται από το uMeltQUARTZ. Όσο μικρότερη είναι η ουρά polyA, τόσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία τήξης (πάνω). Πραγματικές κατανομές τήξης των προϊόντων RT-

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

qPCR μετά από υπερέκφραση ή αποσιώπηση του AUF1 σε κύτταρα SK-N-SH μετά από 48 ώρες (κάτω). Two-way ANOVA,  $n=3$ , \*\*\*\*, Tukey's test για της επιμέρους συγκρίσεις Student's t-test (\*\* $\leq 0.01$ , \*\*\*\* $\leq 0.00001$ ).

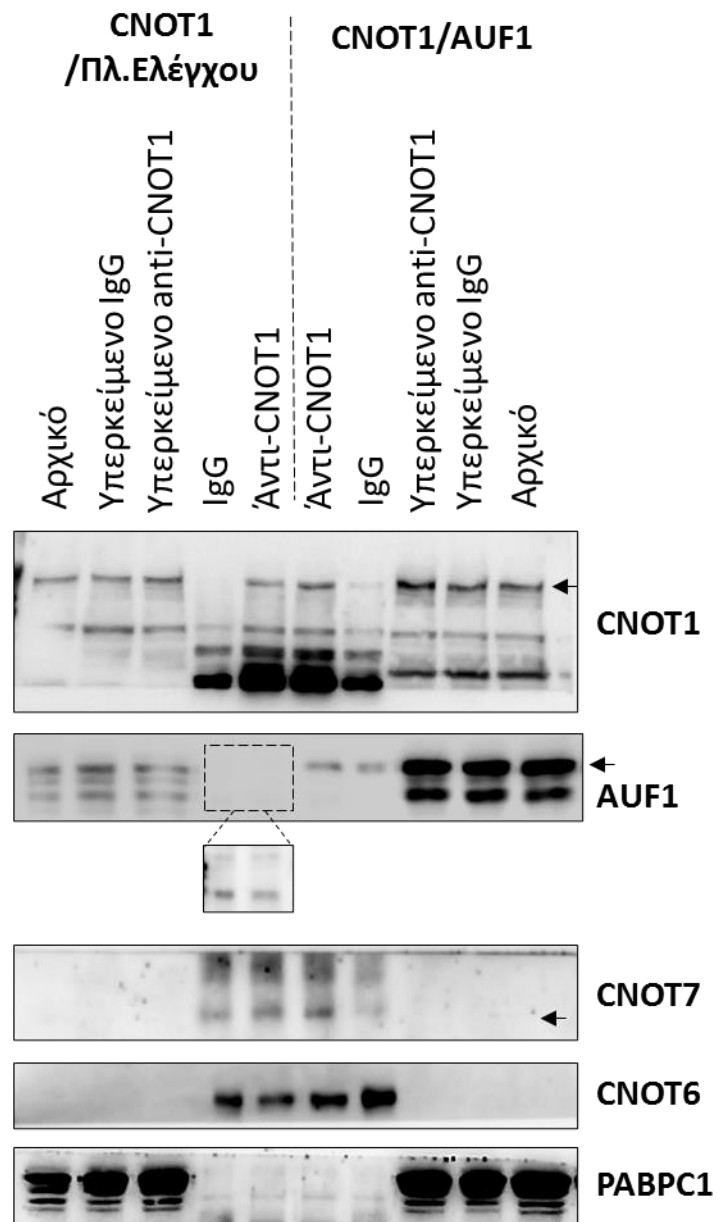
1.5 Η AUF1 στρατολογεί την πρωτεΐνη συναρμογής CNOT1 στο mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Επόμενο στάδιο ήταν η διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου συντελείται η αποαδενυλίωση του βραχέως 3'UTR της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Σε κύτταρα SK-N-SH πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση αυξανόμενης ποσότητας πλασμιδίου υπερέκφρασης της AUF1 και έπειτα από 48 ώρες τα κύτταρα λύθηκαν και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα επώαστηκε με βιοτινυλιωμένο RNA του βραχέως τμήματος του 3'UTR της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και έπειτα με μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (βλ 1.1). Οι κατακρημνισμένες πρωτεΐνες αναλύθηκαν με ανοσοσύπωμα κατά Western. Βρέθηκε πως η αύξηση της ποσότητας AUF1 στο πρωτεϊνικό διάλυμα οδήγησε σε εντονότερη παρουσία της CNOT1, πρωτεΐνης συναρμογής του συμπλόκου αποαδενυλίωσης (Εικόνα 5B). Ελέγχθηκαν και η αποαδενυλίωση CNOT7 και η PABC1 και δεν παρατηρήθηκε στρατολόγηση ή αποτροπή της πρόσδεσής τους στο mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Ένας περιορισμός του πειράματος ήταν η έλλειψη πολύ(A) ουράς στον βιοτινυλιωμένο ανιχνευτή.



**Εικόνα 5. Η AUF1 στρατολογεί την CNOT1 στο mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Α.** Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου κατακρήμνισης πρωτεϊνών προσδεδεμένων σε βιοτινυλιωμένα τμήματα SNCA RNA. **Β.** Ανοσοσύπωμα κατά Western του ολικού και κατακρημνισθέντος πρωτεϊνικού εκχυλίσματος έπειτα από ήπια ή έντονη υπερέκφραση AUF1 σε κύτταρα SK-N-SH για 48 ώρες.

1.6 Η AUF1 στρατολογεί την εξωνουκλεάση CNOT7 στη CNOT1

Η πρωτεΐνη συναρμογής CNOT1 έχει τη δυνατότητα να δημιουργήσει σύμπλοκο με διαφορετικές ομάδες ενζύμων τα οποία ασκούν ποικίλες δράσεις όπως η επεξεργασία rRNA, η εξαγωγή RNA από τον πυρήνα, η ανταπόκριση σε βλάβη στο DNA και η αποαδενυλίωση. Για να ελεγχθεί η υπόθεση πως η AUF1 ενισχύει την αποαδενυλίωση, πραγματοποιήθηκε συν-ανοσοκατακρήμιση με χρήση αντισώματος αντί-CNOT1. Κύτταρα SK-N-SH διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο υπερέκφρασης της AUF1 ή πλασμίδιο ελέγχου και έπειτα από 48 ώρες τα κύτταρα λύθηκαν και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα επώαστηκε με μαγνητικά σφαιρίδια συνδεδεμένα είτε με αντι-Cnot1 αντίσωμα, ή αντι-IgG αντίσωμα (ως έλεγχο). Στα σφαιρίδια αναμένεται να προσδεθεί η ενδογενής CNOT1 και οι πρωτεΐνες συνδεδεμένες σε αυτή. Τα κατακρημιτισμένα εκχυλίσματα εξετάστηκαν με ανοσοσύτρωμα κατά Western. Βρέθηκε πως η CNOT1 προσδένεται με την AUF1, δεδομένο που ενισχύει το αποτέλεσμα της ενότητας 1.5 (Εικόνα 6). Επιπλέον, υπερέκφραση AUF1 οδήγησε σε εμπλουτισμό του εκχυλίσματος αντί-CNOT1 με CNOT7 σε σχέση με το εκχύλισμα αντί-CNOT1 το οποίο επώαστηκε με ενδογενή επίπεδα AUF1.

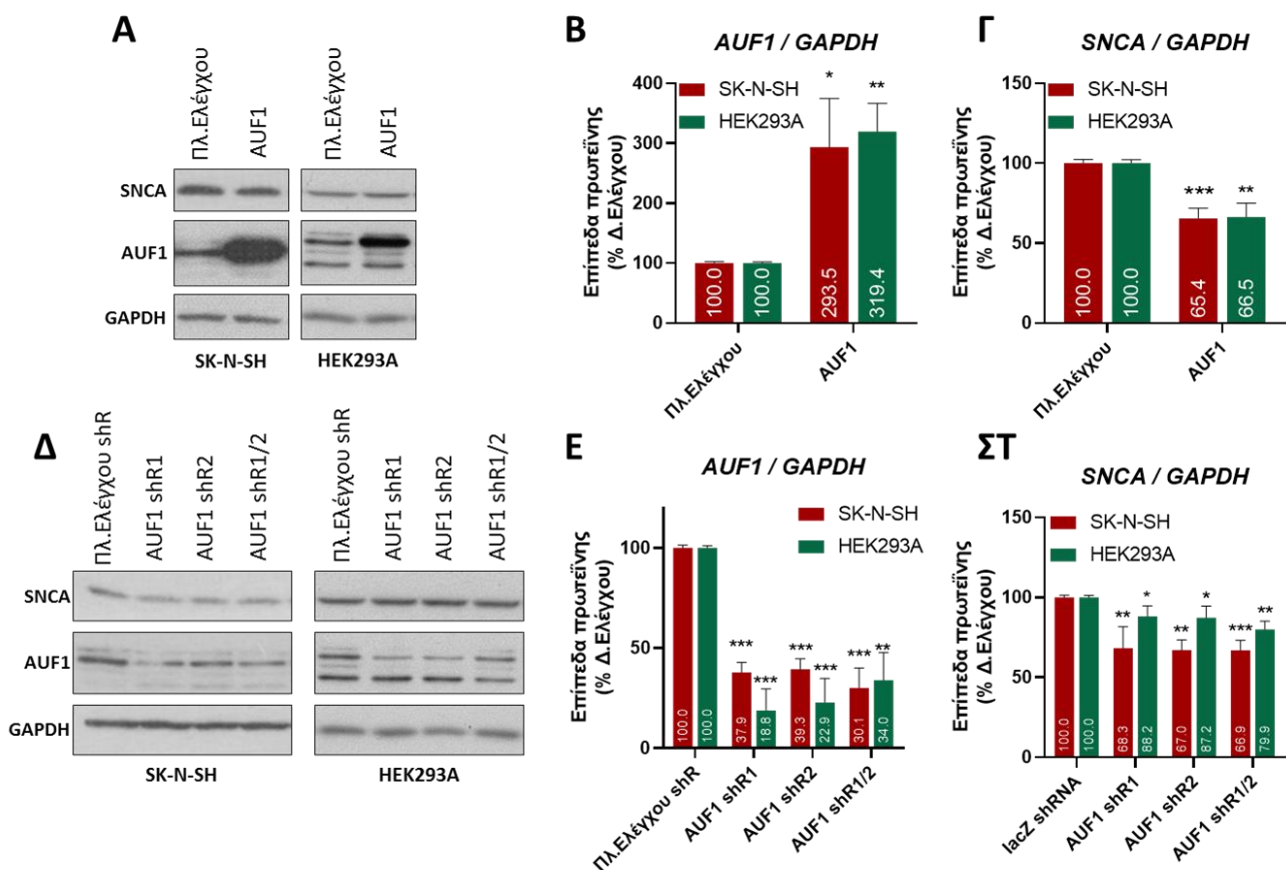


**Εικόνα 6. Η AUF1 στρατολογεί την CNOT7 στην CNOT1.** Ανοσοσύτρωμα κατά Western αρχικού και κατακρημιτισθέντος πρωτεϊνικού εκχυλίσματος έπειτα από υπερέκφραση CNOT1 με ταυτόχρονη υπερέκφραση AUF1 (δεξιά) σε κύτταρα SK-N-SH για 48 ώρες.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

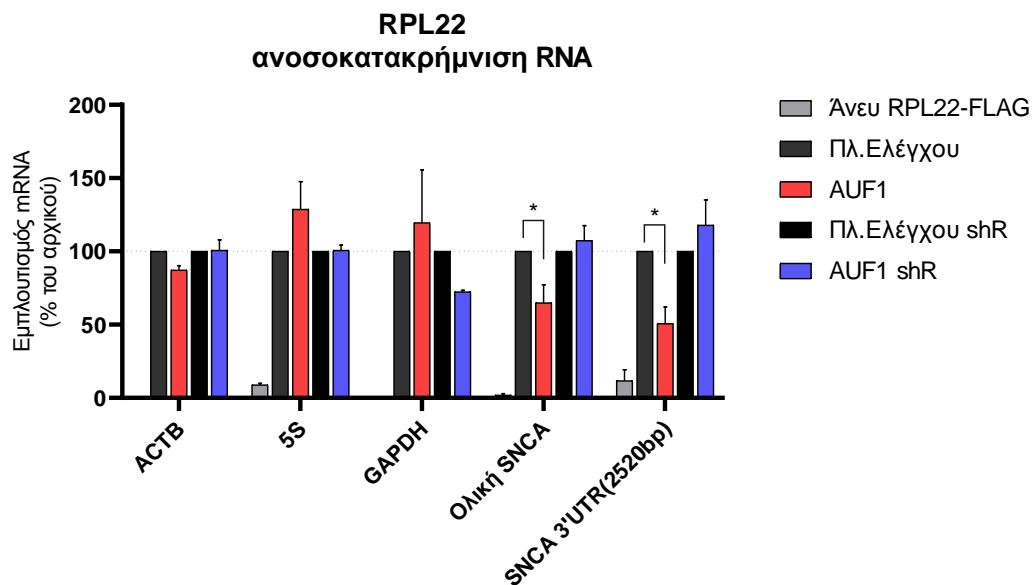
### 1.7 Μεταβολή στα επίπεδα της AUF1 οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της ενδογενούς α-συνουκλεΐνης

Σε επόμενο στάδιο, εξετάστηκε η επίδραση της υπερέκφρασης ή αποσιώπησης της AUF1 στα ενδογενή πρωτεϊνικά επίπεδα α-συνουκλεΐνης. Διαμολύνθηκαν SK-N-SH και HEK293 με πλασμίδια τα οποία υπερεκφράζουν ή αποσιωπούν την AUF1 και έπειτα από 48 ώρες πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των πρωτεϊνών και ανάλυση των δειγμάτων με ανοσοσύτρωμα κατά Western με σκοπό την ποσοτικοποίηση των επιπέδων AUF1, α-συνουκλεΐνης και GAPDH (πρωτεΐνη με σταθερή έκφραση η οποία χρησιμοποιήθηκε ως παρονομαστής στην ποσοτικοποίηση). Τα πλασμίδια επέφεραν την επιθυμητή αύξηση ή μείωση των επιπέδων AUF1 αντίστοιχα και στις δυο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 7B,E). Η υπερέκφραση AUF1 οδήγησε σε μείωση των ενδογενών επιπέδων α-συνουκλεΐνης (Εικ.7Γ), κάτι το οποίο αντιστοιχεί με τη μείωση των επιπέδων mRNA της. Παραδόξως όμως, η αποσιώπηση AUF1 επέφερε και πάλι μείωση των επιπέδων α-συνουκλεΐνης (Εικ.7ΣΤ) παρ' όλη την αύξηση του mRNA της.



**Εικόνα 7. Η επίδραση της AUF1 στα πρωτεϊνικά επίπεδα της α-συνουκλεΐνης.** Υπερέκφραση και αποσιώπηση της AUF1 σε κύτταρα SK-N-SH μέσω διαμόλυνσης για 48 ώρες πριν την απομόνωση πρωτεΐνης και ποσοτικοποίηση των επιπέδων με ανοσοσύτρωμα κατά Western στην περίπτωση της υπερέκφρασης (A) και αποσιώπησης (Δ) AUF1. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων AUF1 (B,E) και SNCA (Γ,ΣΤ). Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=8, (B,Γ) Student's t-test, (E) one-way ANOVA, F=106.5 & 39.8 για SK-N-SH & HEK293A αντίστοιχα, (ΣΤ) one-way ANOVA, F=10.69 & 5.98 για SK-N-SH & HEK293A αντίστοιχα, Tukey's test για της επιμέρους συγκρίσεις (\* $\leq$ 0.05, \*\* $\leq$ 0.01, \*\*\* $\leq$ 0.001)

1.8 Η AUF1 μειώνει την συγγένεια του ριβοσώματος με το mRNA της α-συνουκλεΐνης. Βασιζόμενοι στην πληροφορία πως η AUF1 έχει τη δυνατότητα να προσδένεται σε ακολουθίες IRES, και να επηρεάζει την συναρμολόγηση της μεταφραστικής μηχανής<sup>155,156</sup> επόμενος στόχος ήταν η μελέτη της σχέσης της AUF1 με την πρόσδεση ριβοσομάτων στο mRNA της α-συνουκλεΐνης. Κύτταρα SK-N-SH διαμολύθηκαν με σκοπό την υπερέκφραση ή αποσιώπηση της AUF1 αντίστοιχα ταυτόχρονα με πλασμίδιο το οποίο εκφράζει την πρωτεΐνη της 60S υπομονάδας του ριβοσώματος με ένα επιπρόσθετο οκταπεπτίδιο ονομαζόμενο FLAG. Ο συγκεκριμένος επίτοπος μπορεί να λειτουργήσει ως 'ετικέτα' η οποία αναγνωρίζεται από αντισώματα. Δύο ημέρες μετά τη διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση RNA με σφαιρίδια ρητίνης προσδεδεμένα με αντί-FLAG αντισώμα. Στο εκχύλισμα RNA πραγματοποιήθηκε RT-qPCR για την εκτίμηση της ποσότητας mRNA της α-συνουκλεΐνης με βραχύ ή μακρύ 3'UTR προσδεδεμένες στο ριβόσωμα. Η υπερέκφραση AUF1 απέτρεψε την σύνδεση του ριβοσώματος με το mRNA της α-συνουκλεΐνης τόσο στις βραχείς όσο και στις μακριές ισομορφές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, κάτι το οποίο δεν συνέβη στα mRNA ελέγχου (Εικόνα 8).

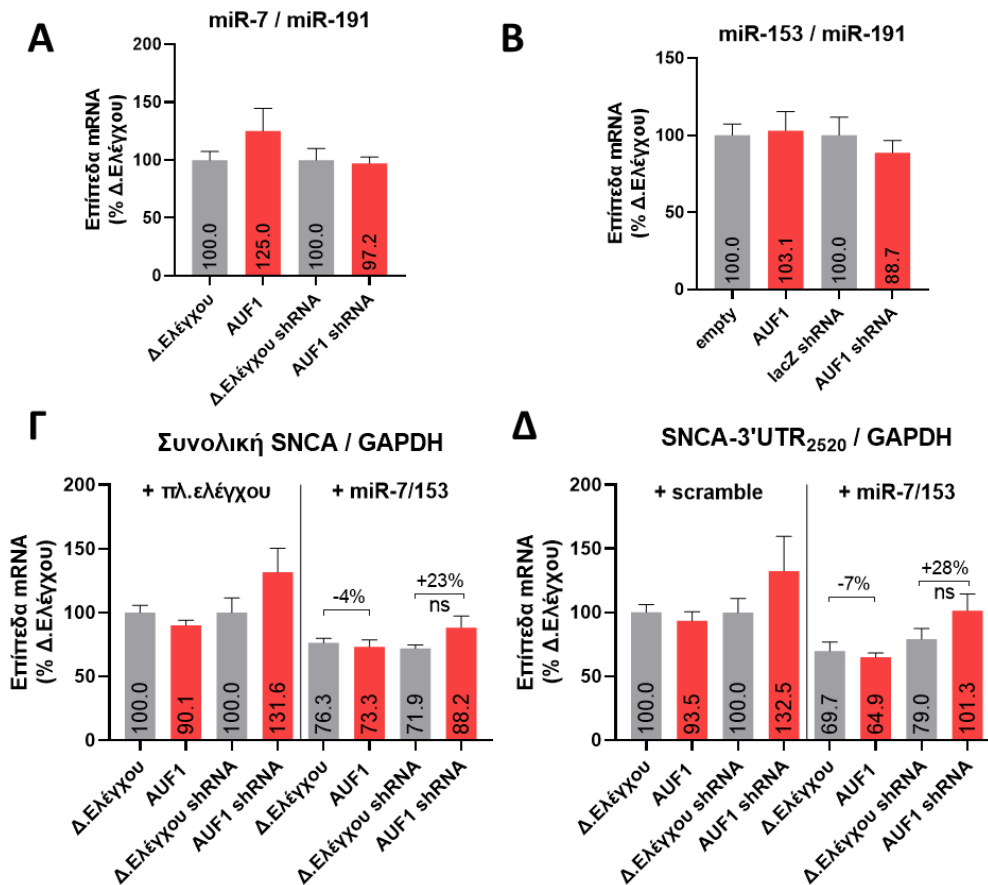


**Εικόνα 8. Η AUF1 μειώνει την συγγένεια του ριβοσώματος με το mRNA της α-συνουκλεΐνης.** Ανοσοκατακρήμνιση RNA σε κύτταρα SK-N-SH έπειτα από υπερέκφραση ή αποσιώπηση AUF1 ταυτόχρονα με υπερέκφραση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης RPL22 σεσημασμένης με οκταπεπτίδιο FLAG για 48 ώρες. Τα επίπεδα mRNA γονιδίων ελέγχου, όπως και του συνολικού και 3'UTR<sub>2520</sub> mRNA της α-συνουκλεΐνης ποσοτικοποιήθηκαν με RT-qPCR. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=3, Student's t-test (\* $\leq$ 0.05).



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.9 Η AUF1 δρα ανεξάρτητα των miRNA-7 & miRNA-153 στο mRNA της α-συνουκλεΐνης  
 Η AUF1 έχει βρεθεί να εμπλέκεται στη βιολογία των miRNA σε ποικίλα επίπεδα, ανάμεσά τους αναστολή της ωρίμανσης των προ-miRNA (pri/pro-miRNA) μέσω αναστολής της μετάφρασης του DICER, επιβοήθηση του φορτώματος των miRNA στο σύμπλεγμα miRISC και επιρροή στην πρόσδεση του miRISC στα mRNA στόχους (σε άλλες περιπτώσεις θετική και σε άλλες ανασταλτική). Επομένως, στοχεύσαμε να διερευνήσουμε το ρόλο της AUF1 στη δράση των γνωστών αναστολέων του mRNA της α-συνουκλεΐνης miR-7 και miR-153<sup>157</sup>. Κύτταρα SK-N-SH διαμολύθηκαν με πλασμίδια υπερέκφρασης ή αποσιώπησης της AUF1 παρουσία και απουσία επιπλέον πλασμιδίου υπερέκφρασης προ-miR-7 και προ-miR-153. Έπειτα από 48 ώρες έγινε απομόνωση RNA, αντίστροφη μεταγραφή και RT-qPCR με σκοπό να ποσοτικοποιηθούν τα διαφορετικά μήκη 3'UTR της συνουκλεΐνης, όπως και τα ώριμα miR-7/153. Χειραγώγηση των επιπέδων AUF1 δεν επέφερε αλλαγή στα επίπεδα ώριμων miR-7/153 (Εικ.9Α, Β). Η παρουσία των miR επέφερε μείωση των συνολικών επιπέδων του συνολικού mRNA της α-συνουκλεΐνης (Εικ.9Γ), όπως και στο mRNA με 3'UTR<sub>2520</sub> (Εικ.9Δ), χωρίς να παρουσιάζει ανταγωνιστική ή θετική ανάδραση σε σχέση με τα επίπεδα AUF1, καθώς τα επίπεδα mRNA της α-συνουκλεΐνης μπορούν να εξαχθούν ως άθροισμα των δυο συνισταμένων.

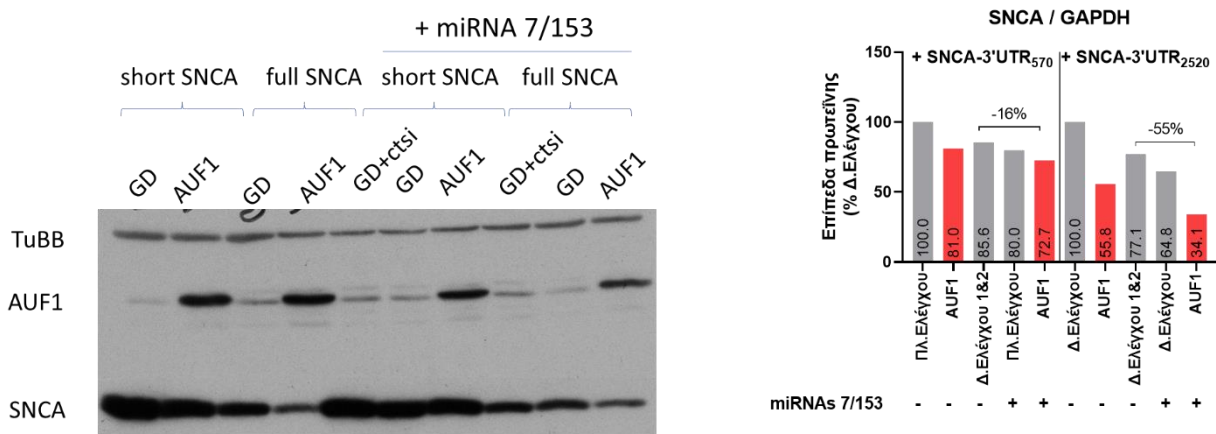


**Εικόνα 9.** Η AUF1 δρα ανεξάρτητα των miRNA-7 & miRNA-153 στο mRNA της α-συνουκλεΐνης. Κύτταρα SK-N-SH συλλέχθηκαν 48 ώρες μετά την υπερέκφραση ή την αποσιώπηση του AUF1 και τα επίπεδα των ώριμων miR-7 (Α) και miR-153 (Β) μετρήθηκαν με τη χρήση RT-qPCR. Σαράντα οκτώ

ώρες μετά τη συν-διαμόλυνση κυττάρων SK-N-SH με πλασμίδιο που εκφράζει τόσο τον miR-7 όσο και τον miR-153 με πλασμίδια έκφρασης ή αποσίωπησης του AUF1 μετρήθηκαν επίπεδα συνολικού και 3'UTR<sub>2520</sub> mRNA της α-συνουκλεΐνης με τη χρήση RT-qPCR (Γ,Δ). Μέσος όρος ±SD, n=5, (A,B) one-way ANOVA, F=0.451 & 0.32 για A & B αντίστοιχα.

1.10 Η AUF1 δρα ανεξάρτητα των miRNA-7 & miRNA-153 στα πρωτεϊνικά επίπεδα της α-συνουκλεΐνης

Στα πλαίσια της μελέτης της πιθανής επίδρασης της AUF1 στην ανασταλτική δράση των miRNA7/153 στο mRNA της α-συνουκλεΐνης θελήσαμε να διερευνήσουμε το επίπεδο της πρωτεΐνης, προερχόμενο μάλιστα από mRNA με διαφορετικά μήκη 3'UTR. Σε κύτταρα SK-N-SH μέσω διαμόλυνσης, υπερέκφραστηκε AUF1 παρουσία και απουσία πλασμιδίου υπερέκφρασης miR-7 και miR-153 σε περιπτώσεις ταυτόχρονης παρουσίας μικρής ποσότητας πλασμιδίων τα οποία παράγουν mRNA της α-συνουκλεΐνης περιέχον την κωδικεύουσα περιοχή και 3'UTR 570 ή 2520 βάσεων. Έπειτα από 48ώρες έγινε εκχύλιση των κυττάρων και τα δείγματα αναλύθηκαν με ανοσοσύτρωμα κατά Western. Ομοίως με το αντίστοιχο πείραμα ελέγχου του mRNA, η αυξημένη παρουσία AUF1 μείωσε τα επίπεδα α-συνουκλεΐνης και αυξημένα επίπεδα miR-7/153 μείωσαν τα επίπεδα συνουκλεΐνης, αλλά δεν εμφανίστηκε ανταγωνισμός ή θετική ανάδραση (Εικόνα 10). Φαίνεται η δράση τους στην α-συνουκλεΐνη να τελείται ανεξάρτητα.

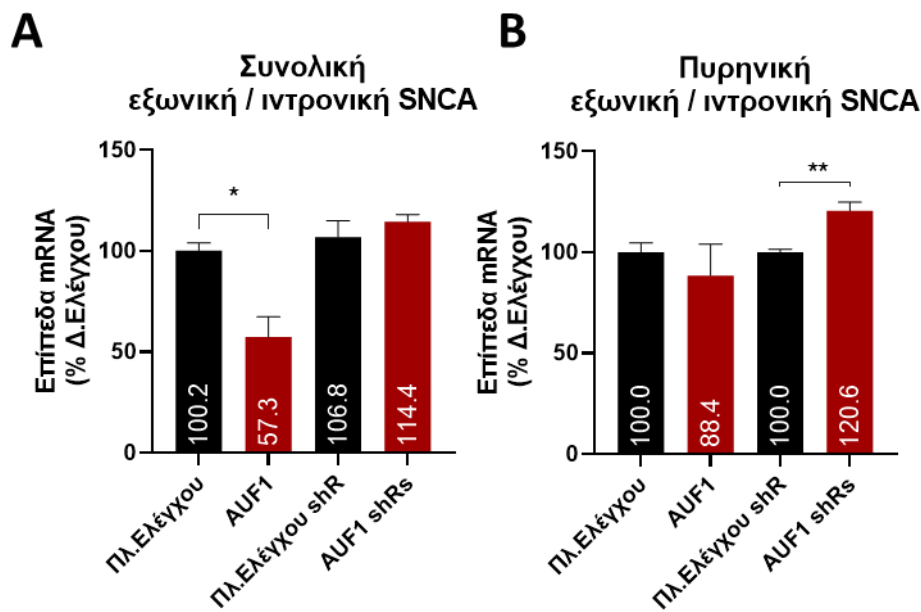


**Εικόνα 10.** Η AUF1 δρα ανεξάρτητα των miRNA-7 & miRNA-153 στα πρωτεϊνικά επίπεδα της α-συνουκλεΐνης. Έπειτα από υπερέκφραση AUF1 ταυτόχρονα με ήπια υπερέκφραση πλασμιδίων SNCA-CDS-3'UTR<sub>570bp</sub> ή SNCA-CDS-3'UTR<sub>2520bp</sub> παρουσία και απουσία πλασμιδίου υπερέκφρασης miRNA-7 & miRNA-153 σε κύτταρα SK-N-SH για 48 ώρες συλλέχθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και μετρήθηκαν τα επίπεδα α-συνουκλεΐνης με ανοσοσύτρωμα κατά Western.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

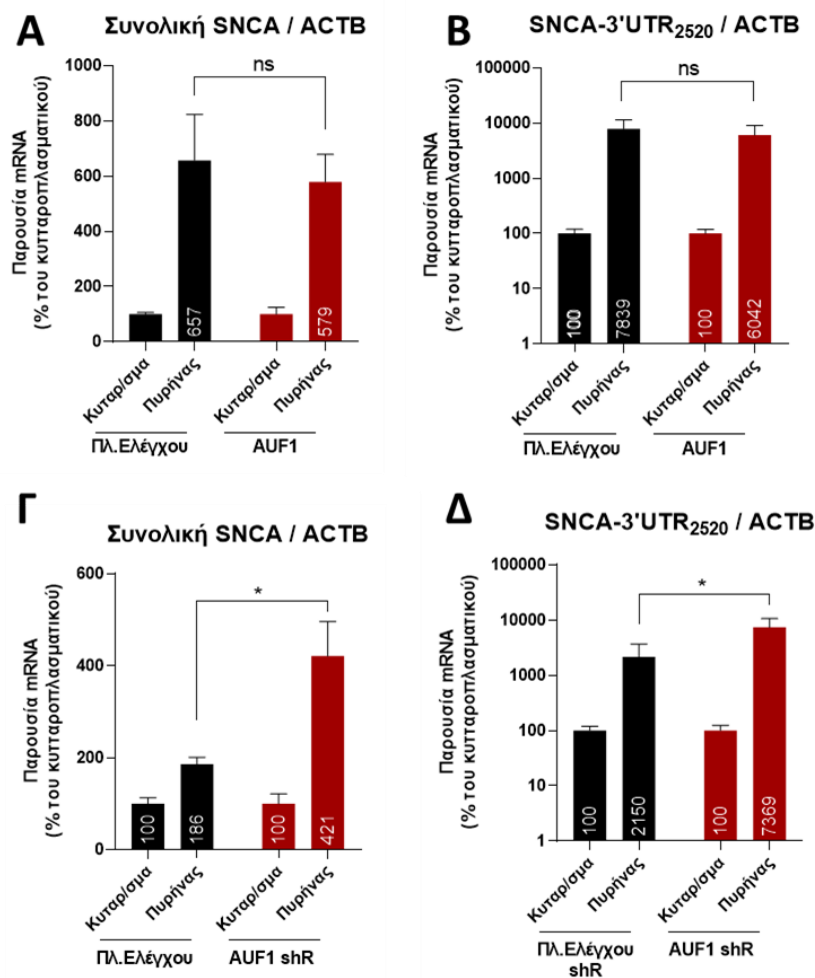
### 1.11 Η AUF1 επηρεάζει την ωρίμανση του προ-mRNA της $\alpha$ -συνουκλεΐνης

Στο παρόν εργαστήριο έχει βρεθεί πως η AUF1 συνεργάζεται με τις νευρωνικές ELAVL ώστε να πραγματοποιηθεί το μάτισμα της APP<sup>158</sup>. Επομένως θελήσαμε να εξετάσουμε πιθανή επίδραση της AUF1 στην επεξεργασία και ωρίμανση του μεταγράφου της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Στην κυτταρική σειρά SK-N-SH πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση πλασμιδίων με σκοπό την υπερέκφραση ή αποσιώπηση της AUF1 και έπειτα από 48 ώρες πραγματοποιήθηκε πυρηνική κλασματοποίηση, απομόνωση RNA από τα κλάσματα και ποσοτικοποίηση ιντρονικού RNA  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (ιντρόνιο 4) συγκριτικά με το ώριμο (με εκκινήτες ανάμεσα στο 4<sup>ο</sup> και το 6<sup>ο</sup> εξώνιο, περιοχή η οποία είναι παρούσα σε όλες τις ισομορφές). Η αναλογία εξωνικού/ιντρονικό SNCA mRNA βρέθηκε μειωμένη στην περίπτωση υπερέκφρασης της AUF1 στο συνολικό λύμα των κυττάρων και όχι στο πυρηνικό κλάσμα (Εικόνα 11), δεδομένο που συνάδει με την προηγούμενη παρατήρηση της ικανότητας AUF1 για αποαδενυλίωση. Εν αντιθέσει, η αποσιώπηση του AUF1 αύξησε κατά 21% τα επίπεδα του ώριμου (εξωνικού) SNCA mRNA στον πυρήνα, υποδεικνύοντας ότι ο AUF1 παρεμβαίνει στην ωρίμανση των μεταγράφων SNCA.



**Εικόνα 11.** Η AUF1 επηρεάζει την ωρίμανση του προ-mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Μέτρηση του λόγου του ώριμου mRNA προς το προ-mRNA  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε πυρηνικά (A) και ολικά (B) εκχυλίσματα κυττάρων SK-N-SH 48 ώρες μετά την υπερέκφραση ή την αποσιώπηση του AUF1 με χρήση RT-qPCR. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=4, one-way ANOVA, (A) F=13.39, (B) F=5.35, Tukey's test για της επιμέρους συγκρίσεις (\* $\leq$ 0.05, \*\* $\leq$ 0.01).

1.12 Η απουσία AUF1 αποτρέπει την έξοδο του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης από τον πυρήνα. Ανάμεσα στις λειτουργίες της AUF1 ανήκει και η μεταφορά ορισμένων mRNA στόχων του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα<sup>159</sup>. Στο παρών πείραμα λοιπόν μελετήσαμε την πιθανότητα εμπλοκής της AUF1 στη μεταφορά των mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης με διαφορετικά μήκη 3'UTR. Κύτταρα SK-N-SH διαμολύνθηκαν με πλασμίδια με σκοπό την υπερέκφραση ή αποσιώπηση της AUF1 και 48 ώρες μετά πραγματοποιήθηκε πυρηνική κλασματοποίηση, απομόνωση RNA από τα κλάσματα και ποσοτικοποίηση mRNA συνολικής συνουκλεΐνης, όπως και της ισομορφής με το 3'UTR<sub>2520</sub> με τη χρήση RT-qPCR. Η αποσιώπηση της AUF1 επέφερε έντονη συγκράτηση του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στο πυρηνικό κλάσμα τόσο στο σύνολό του (Εικόνα 12Γ) όσο και στην ισομορφή με επίμηκες 3'UTR (Εικ.12Δ).



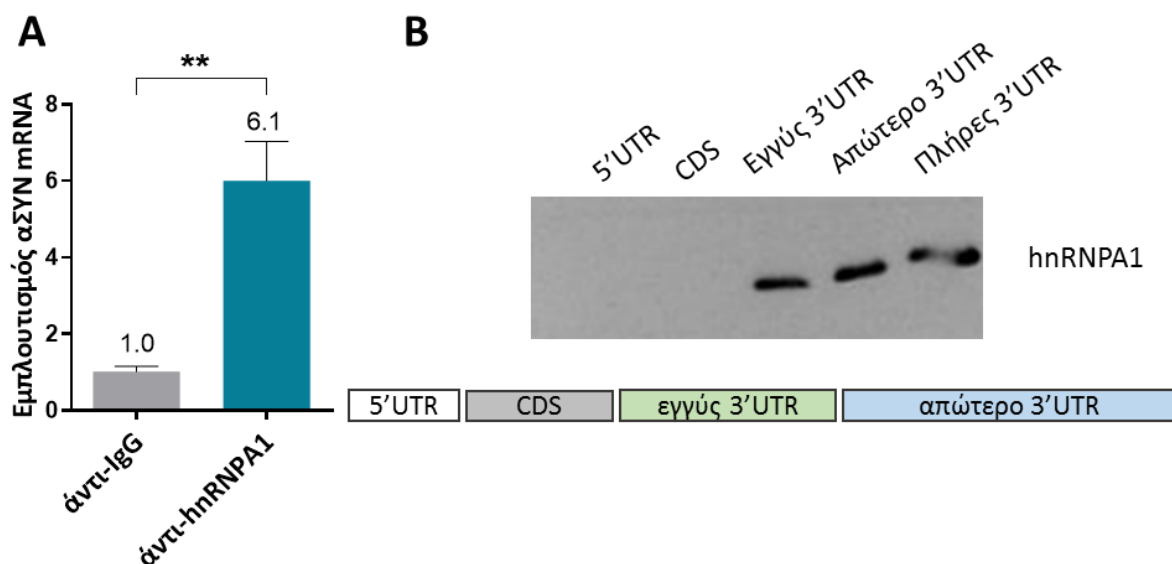
**Εικόνα 12.** Η απουσία AUF1 αποτρέπει την έξοδο του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης από τον πυρήνα. Μέτρηση του κυτταροπλασματικών και πυρηνικών επιπέδων συνολικού (A,Γ) και 3'UTR<sub>2520</sub> (B, Δ) mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης με τη χρήση RT-qPCR έπειτα από κυτταρική κλασματοποίηση κυττάρων SK-N-SH τα οποία έχουν υποστεί υπερέκφραση (πάνω) ή αποσιώπηση (κάτω) AUF1. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=3, Student's t-test (\* $\leq$ 0.05).

## 2.hnRNPA1

### 2.1 Η hnRNPA1 προσδένεται στο RNA της α-συνουκλεΐνης

Αρχικά, με σκοπό την επαλήθευση του ευρήματος συγγένειας hnRNPA1-α-συνουκλεΐνης από την πρωτεωμική ανάλυση, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση RNA (RNA-IP) σε νευροβλαστικά κύτταρα SK-N-SH. Το κατακρημισμένο mRNA με χρήση αντι-hnRNPA1 αντισώματος και αντί-IgG για συνθήκη ελέγχου ελέγχθηκε με real time PCR προς μέτρηση των σχετικών επίπεδων mRNA της α-συνουκλεΐνης. Το mRNA της α-συνουκλεΐνης βρέθηκε εμπλουτισμένο στα αντι-hnRNPA1 δείγματα συγκριτικά με τα αντί-IgG δείγμα, υποστηρίζοντας έτσι την παρατήρηση της πρωτεωμικής ανάλυσης (Εικόνα 13A)

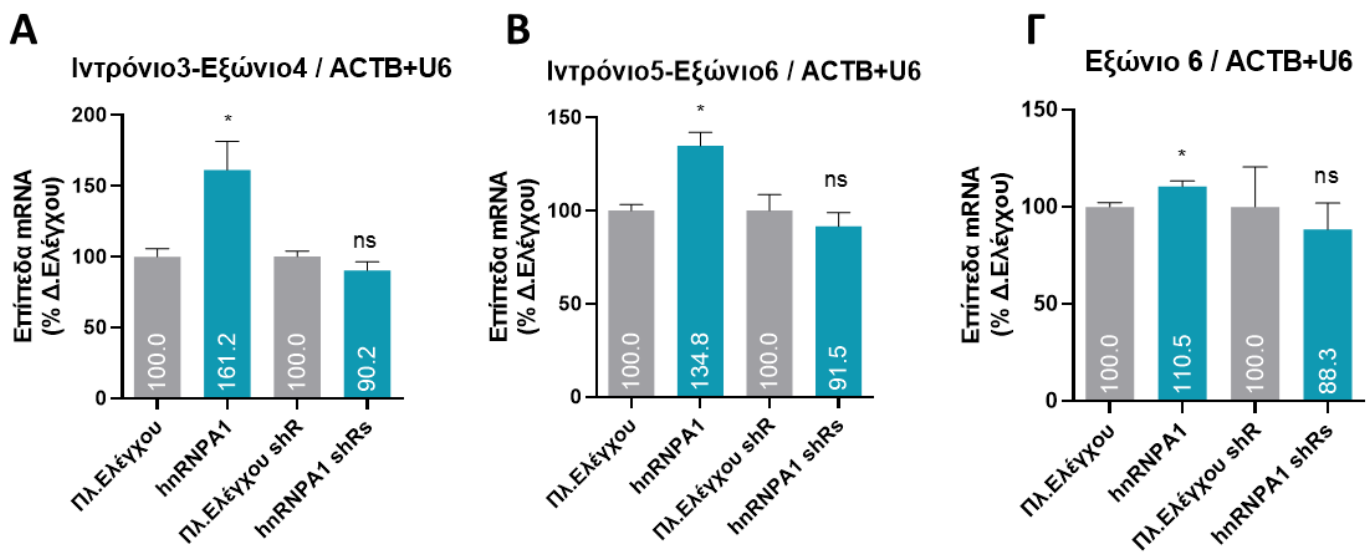
Σε επόμενο στάδιο, ελέγχθηκε η πιθανότητα πρόσδεσης της hnRNPA1 σε περιοχές του mRNA της α-συνουκλεΐνης εκτός του 3'UTR. Ομοίως με την διαδικασία κατακρήμισης στην μελέτη του AUF1 (Εικ.1), με *in vitro* μεταγραφή παρήχθησαν ως ανιχνευτές βιοτινυλιωμένα τμήματα mRNA της α-συνουκλεΐνης τα οποία περιέχουν τις ακολουθίες του 5' αμετάφραστο άκρου, της κωδικεύουσας περιοχής, εγγύς 3'UTR έως τις πρώτες 560 βάσεις αυτού, απώτερο 3'UTR από την 600ή έως την 2520ή βάση του και τέλος ολόκληρο το mRNA. Οι ανιχνευτές επώαστηκαν αρχικά με εκχύλισμα ανθρώπινων νευροβλαστικών κυττάρων SK-N-SH και έπειτα με μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης. Η σχετική παρουσία hnRNPA1 ελέγχθηκε σε ανοσοσύπωμα κατά Western με αντίσωμα αντι-hnRNPA1. Το πείραμα έδειξε πως η hnRNPA1 προσδένεται αποκλειστικά στο 3' αμετάφραστο άκρο, τόσο στο εγγύς όσο και στο απώτερο τμήμα, υποδεικνύοντας την παρουσία περισσότερων της μιας θέσης πρόσδεσης στο 3'UTR (Εικ.13B).



**Εικόνα 13.** Η hnRNPA1 προσδένεται στο 3'UTR της α-συνουκλεΐνης. **A.** Ανοσοκατακρήμιση RNA σε νευροβλαστικά κύτταρα SK-N-SH **B.** Κατακρήμιση πρωτεϊνών εκχυλίσματος κυττάρων SK-N-SH με βιοτινυλιωμένους ανιχνευτές για τις λειτουργικές και ρυθμιστικές περιοχές του mRNA της συνουκλεΐνης. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=3, Student's t-test (\*\* $\leq$ 0.01).

## 2.2 Η hnRNP A1 ενισχύει την μεταγραφή της $\alpha$ -συνουκλεΐνης

Δεδομένης της βιβλιογραφικής συσχέτισης της hnRNP A1 με τη ρύθμιση της μεταγραφής, εξετάστηκε η επίδραση της μεταγραφή του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα κύτταρα SK-N-SH. Πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση και αποσιώπηση της hnRNP A1 μέσω διαμόλυνσης με κατάλληλο πλασμίδιο και 48 ώρες μετά εκτελέστηκε κυτταρική κλασματοποίηση, απομόνωση ολικού mRNA και ανάλυση με real time PCR. Χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινήτων τα οποία καλύπτουν τις περιοχές ιντρονίου3-εξωνίου4 (Εικ.14Α), ιντρονίου5-εξωνίου6 (Εικ.14Β) όπως και του εγγύς εξωνίου 6 (3'αμετάφραστο άκρο) (Εικ.14Γ) στο πυρηνικό κλάσμα, όπου και παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων προ-mRNA στις υπό μελέτη περιοχές σε συνθήκη υπερέκφρασης της hnRNP A1. Η αποσιώπηση του hnRNP A1 επέφερε μόνο πτωτική τάση στα επίπεδα του ανώριμου mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης.

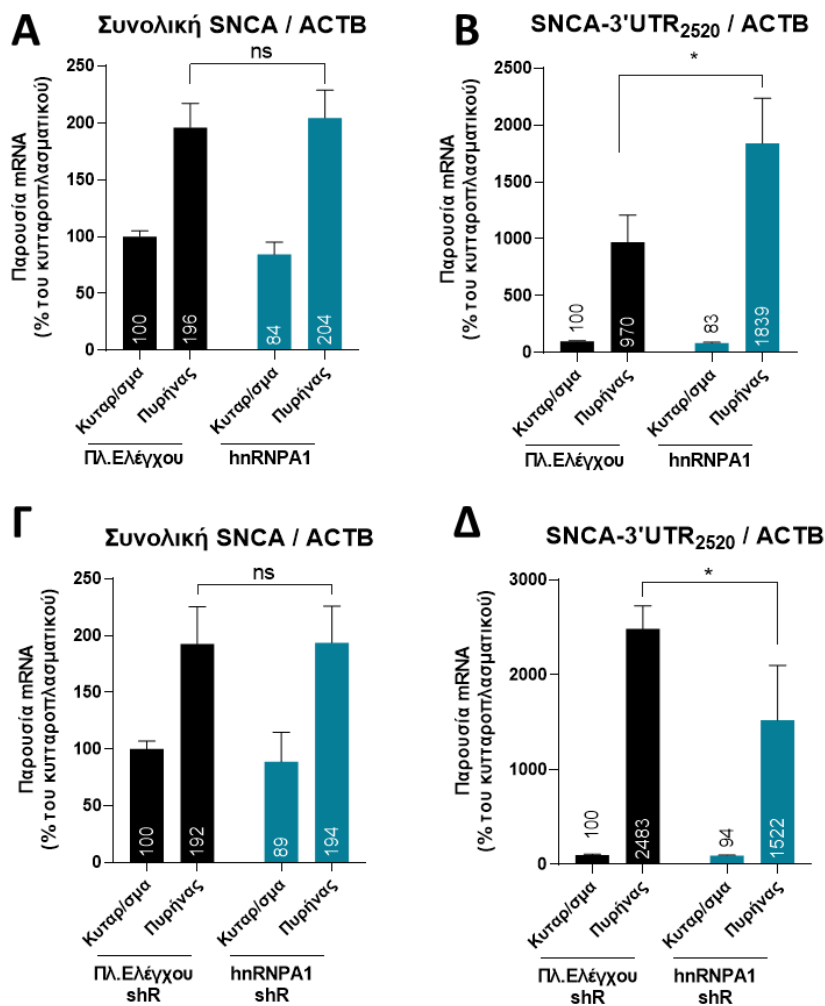


**Εικόνα 14.** Η hnRNP A1 ενισχύει την μεταγραφή της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Μέτρηση των επιπέδων του προ-mRNA (A,B) και ώριμου (Γ) mRNA  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων SK-N-SH 48 ώρες μετά την υπερέκφραση ή την αποσιώπηση της hnRNP A1 με χρήση RT-qPCR. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=4, one-way ANOVA, F=8.61 (A), 7.73 (B), 1.57 (Γ), Tukey's test για της επιμέρους συγκρίσεις (\* $\leq$ 0.05).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

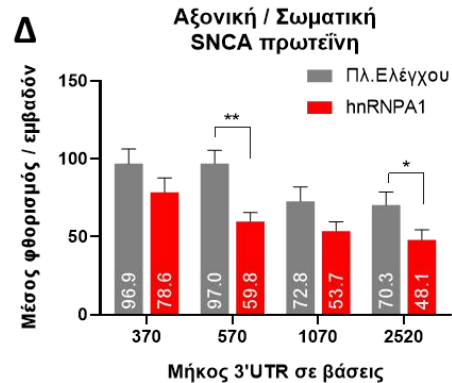
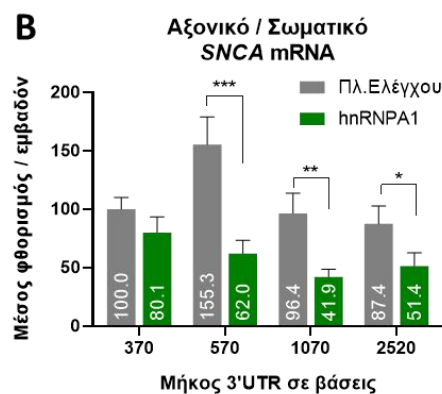
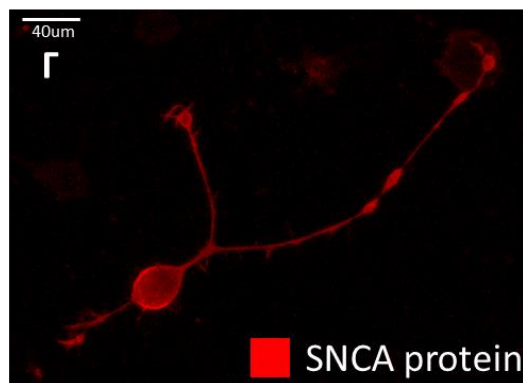
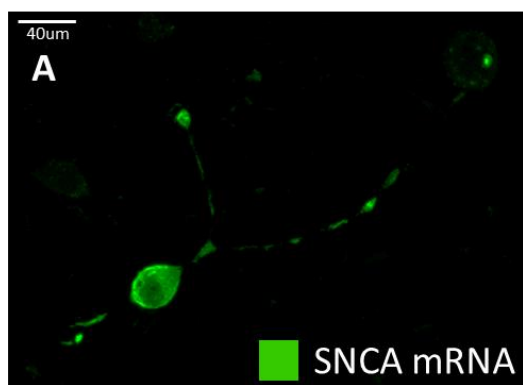
### 2.3 Η hnRNPA1 επηρεάζει διαφορετικά την έξοδο των ισομορφών mRNA της α-συνουκλεΐνης από τον πυρήνα

Ανάμεσα στις γνωστές λειτουργίες της hnRNPA1 είναι η ρύθμιση της εξαγωγής ώριμων mRNA από τον πυρήνα, την τοποθέτηση στο κύτταρο και την δυναμική των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών κοκκίων. Έπειτα από διαμόλυνση κυττάρων SK-N-SH με πλασμίδια που οδηγούν σε υπερέκφραση ή αποσιώπηση της hnRNPA1 για 48 ώρες πραγματοποιήθηκε κυτταρική κλασματοποίηση και αναλύθηκαν τα επίπεδα ισομορφών του 3'UTR της α-συνουκλεΐνης στο πυρηνικό και το κυτταροπλασματικό κλάσμα. Η υπερέκφραση της hnRNPA1 επέφερε συγκράτηση της μακριάς ισομορφής 3'UTR (SNCA-3'UTR<sub>2520</sub>) στον πυρήνα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (Εικόνα 15B), ενώ η αποσιώπησή της αύξησε την έξοδο της ισομορφής κατά 38% (Εικ.15Δ). Τα συνολικά επίπεδα mRNA της α-συνουκλεΐνης δεν φάνηκαν να επηρεάζονται από τις μεταβολές στα επίπεδα hnRNPA1 (Εικ15A,B).



**Εικόνα 15.** Η A1 επηρεάζει διαφορετικά την έξοδο των ισομορφών mRNA της α-συνουκλεΐνης από τον πυρήνα. Μέτρηση του κυτταροπλασματικών και πυρηνικών επιπέδων συνολικού (A, Γ) και 3'UTR<sub>2520</sub> (B, Δ) mRNA της α-συνουκλεΐνης με τη χρήση RT-qPCR έπειτα από κυτταρική κλασματοποίηση κυττάρων SK-N-SH τα οποία έχουν υποστεί υπερέκφραση (πάνω) ή αποσιώπηση (κάτω) hnRNPA1. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=3, Student's t-test (\* $\leq$ 0.05).

2.4 Η hnRNPA1 μειώνει την αξονική παρουσία του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και πρωτεΐνης. Συνεχίζοντας τη μελέτη της επίδρασης της hnRNPA1 στην τοποθέτηση του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στο κύτταρο, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη ανοσοκυτταροχημική χρώση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης με φθορίζον σύστημα αντισωμάτων και *in situ* υβριδοποίηση του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης με φθορίζοντες ανιχνευτές συμπληρωματικούς με το 3'UTR της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε διαφοροποιημένα κατεχολαμινεργικά κύτταρα μύος CAD τα οποία χαρακτηρίζονται από έντονη αξονική εκβλάστηση και χαμηλά ενδογενή επίπεδα  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (Εικόνα 16Α, Γ). Τα κύτταρα υπέστησαν υπερέκφραση hnRNPA1 μέσω διαμόλυνσης ταυτόχρονα με ήπια υπερέκφραση πλασμιδίων τα οποία περιέχουν την κωδικεύουσα περιοχή του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και τις διαφορετικές ισομορφές του 3'UTR για 24 ώρες. Η hnRNPA1 μείωσε τα αξονικά επίπεδα mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στις πιο επιμήκεις ισομορφές (Εικ.16B), κάτι το οποίο αντικατοπτρίστηκε στα πρωτεϊνικά επίπεδα (Εικ.16Δ).



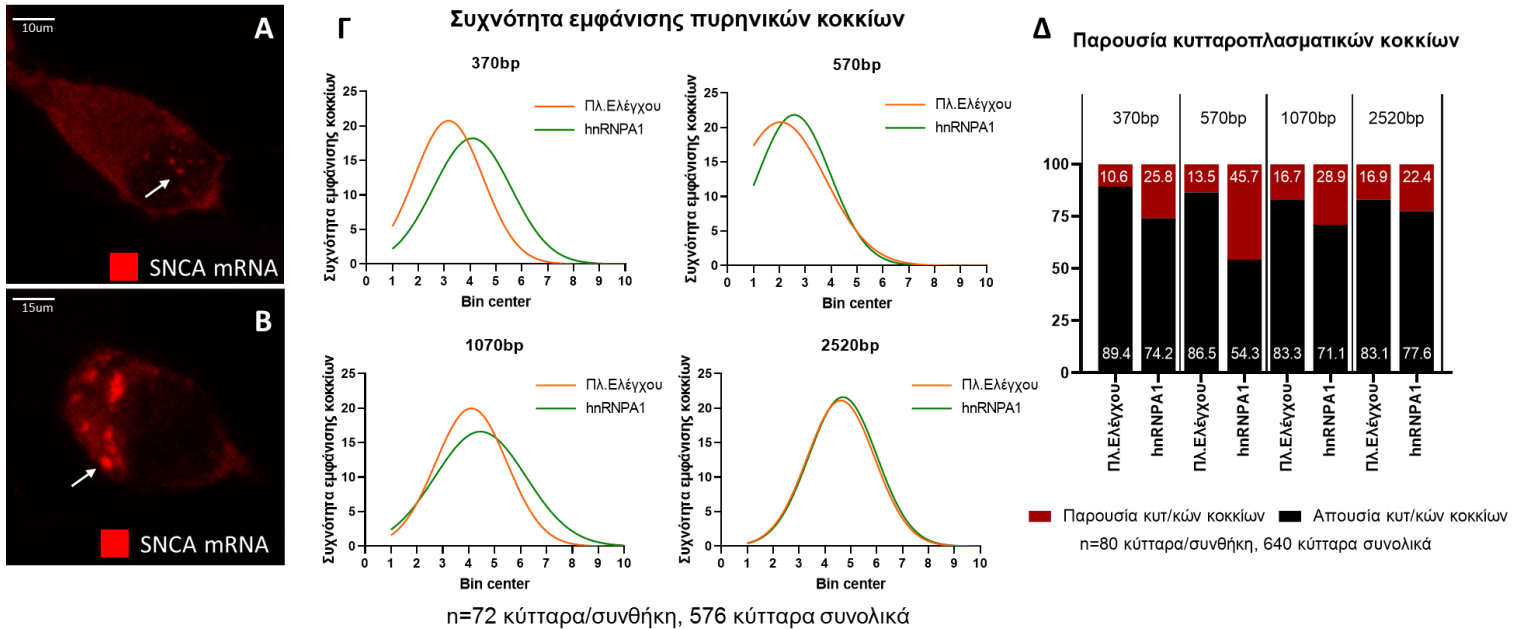
**Εικόνα 16.** Η hnRNPA1 μειώνει την αξονική παρουσία του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και πρωτεΐνης. Κατανομή του mRNA (A) και της πρωτεΐνης (Γ) της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε διαφοροποιημένα CAD κύτταρα. Σύγκριση του λόγου αξονικού μέσου φθορισμού/εμβασδόν προς το σωματικό (B για mRNA, Δ, για πρωτεΐνη). Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=32, Student's t-test (\* $\leq$ 0.05, \*\* $\leq$ 0.01, \*\*\* $\leq$ 0.001).



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.5 Η hnRNPA1 επηρεάζει τον σχηματισμό των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών κοκκίων της α-συνουκλεΐνης

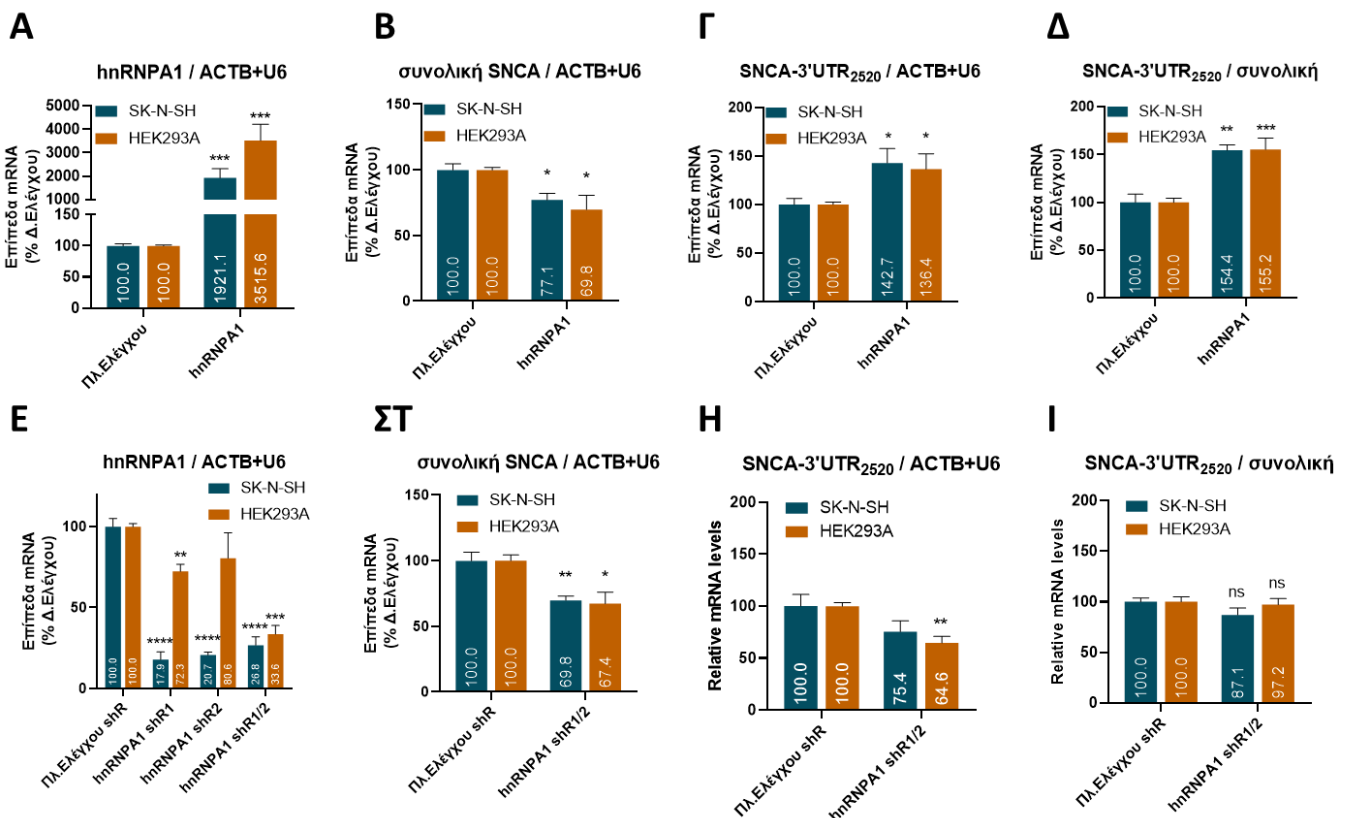
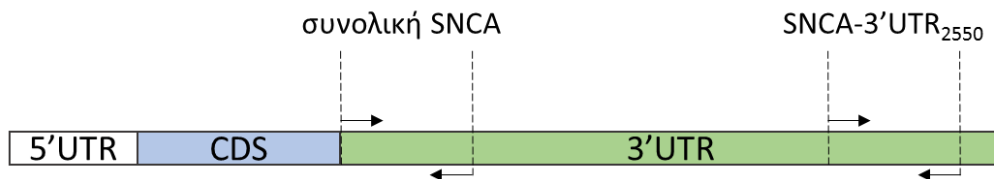
Στη συνέχεια εκτιμήθηκαν οι διαφορές στην παρουσία πυρηνικών και κυτταροπλασματικών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών κοκκίων συναρτήσει των επιπέδων hnRNPA1 και του μήκους του *SNCA* 3'UTR στα *in situ* υβριδοποιημένα CAD κύτταρα που μόλις αναφέρθηκαν (ενότητα 2.4). Η υπερέκφραση hnRNPA1 επαύξησε τον αριθμό των πυρηνικών κοκκίων στην περίπτωση του βραχύτερου 3'UTR της α-συνουκλεΐνης (Εικόνα 17Γ) και την πιθανότητα εμφάνισης κυτταροπλασματικών κοκκίων στα δυο βραχύτερα 3'UTR (Εικ.17Δ).



**Εικόνα 17.** Η hnRNPA1 επηρεάζει τον σχηματισμό των ριβονουκλεοπρωτεϊνικών κοκκίων της α-συνουκλεΐνης. Παραδείγματα πυρηνικού (A) και κυτταροπλασματικού (B) στίγματος *SNCA* mRNA σε διαφοροποιημένα CAD κύτταρα. Γ. Ιστόγραμμα της συχνότητας εμφάνισης πυρηνικού mRNA για τα διαφορετικά μήκη 3'UTR. Δ. Ποσοστό κυτάρων με κυτταροπλασματικά στίγματα mRNA για τα διαφορετικά μήκη 3'UTR της α-συνουκλεΐνης.

2.6 Διακύμανση στα επίπεδα hnRNPA1 διαταράσσει τις ποσότητες των ενδογενών μεταγράφων της α-συνουκλεΐνης

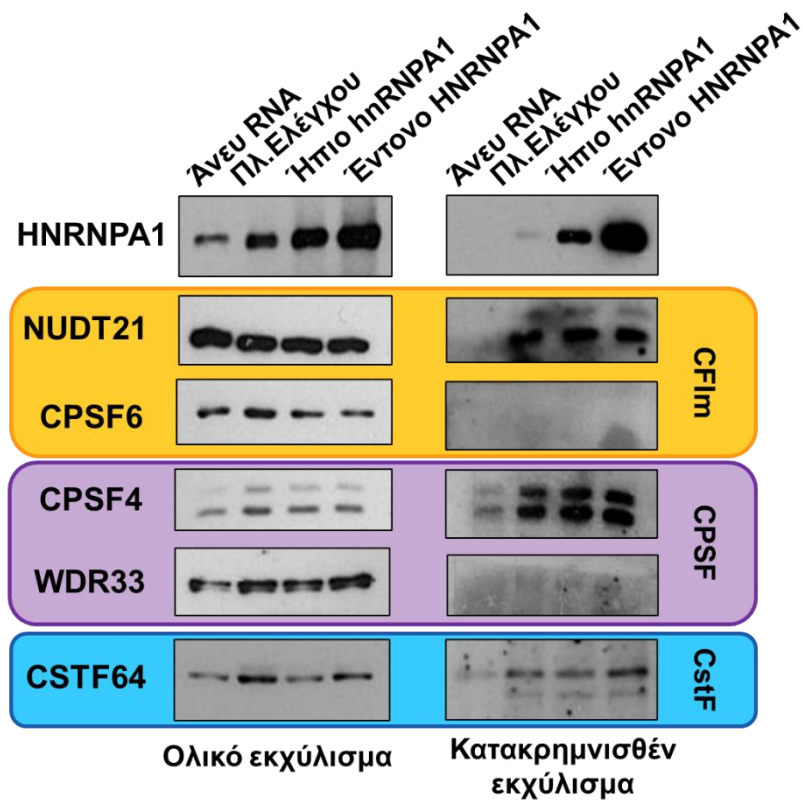
Πέρα από την τοποθέτηση στο κύτταρο, εξετάστηκε η επίδραση της hnRNPA1 στα επίπεδα των διαφορετικών ισομορφών mRNA της α-συνουκλεΐνης. Μέσω διαμόλυνσης με κατάλληλα πλασμίδια πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση και αποσιώπηση της hnRNPA1 τόσο σε ανθρώπινα νευροβλαστικά SK-N-SH κύτταρα όσο και σε ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα HEK293A. Έπειτα από 48 ώρες απομονώθηκε ολικό RNA και αναλύθηκαν τα ενδογενή επίπεδα συνολικής α-συνουκλεΐνης (εγγύς 3'UTR), του mRNA της α-συνουκλεΐνης με επίμηκες 3'UTR, όσο και τα επίπεδα hnRNPA1 mRNA προς ποιοτικό έλεγχο της διαμόλυνσης. Και στις δυο κυτταρικές σειρές η υπερέκφραση της hnRNPA1 επέφερε μείωση των συνολικών επιπέδων mRNA της α-συνουκλεΐνης κατά 30% (Εικόνα 18B). Αντιθέτως, η ισομορφή με επίμηκες 3'UTR γνώρισε αύξηση των επιπέδων της της τάξης του 60% στις υπό εξέταση κυτταρικές σειρές (Εικ.18Γ). Ως αποτέλεσμα, η αναλογία των ισομορφών 3'UTR παρόντων στο κύτταρο μεταβλήθηκε ευνοώντας τις επιμήκεις (Εικ.18Δ). Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως και η αποσιώπηση της hnRNPA1 μείωσε τα συνολικά επίπεδα mRNA της α-συνουκλεΐνης στις κυτταρικές σειρές (Εικ.18ΣΤ, Η), με τη διαφορά πως δεν μετέβαλε την αναλογία των ισομορφών καθώς μείωσε αναλόγως τα επίπεδα της επιμήκου ισομορφής (Εικ.18Ι).



**Εικόνα 18. Η επίδραση της hnRNP1 στα επίπεδα του mRNA της α-συνουκλεΐνης.** Υπερέκφραση και αποσιώπηση της hnRNP1 σε κύτταρα SK-N-SH μέσω διαμόλυνσης για 48 ώρες πριν την απομόνωση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA. Μέτρηση επιπέδων hnRNP1 (A, Δ) mRNA προς έλεγχο της ποιότητας διαμόλυνσης. Επίπεδα συνολικού (B, ΣΤ), 3'UTR<sub>2520</sub> (Γ, Η), όπως και του λόγου 3'UTR<sub>2520</sub> προς συνολικό (Δ,Ι) mRNA α-συνουκλεΐνης με ταυτόχρονη υπερέκφραση (πάνω) ή αποσιώπηση (κάτω) hnRNP1. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=8 & 4 για SK-N-SH & HEK293A αντίστοιχα, (A-Δ, ΣΤ-Ι) Student's t-test, (Δ) one-way ANOVA, F=58.35 & 10.48 για SK-N-SH & HEK293A αντίστοιχα, Tukey's test για της επιμέρους συγκρίσεις (\* $\leq$ 0.05, \*\* $\leq$ 0.01, \*\*\* $\leq$ 0.001, \*\*\*\* $\leq$ 0,0001).

2.7 Η hnRNP1 δεν παρεμβαίνει άμεσα στον μηχανισμό εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης

Στη συνέχεια, εξετάστηκε ο μηχανισμός με τον οποίο το hnRNP1 οδηγεί την εναλλακτική ωρίμανση του mRNA της α-συνουκλεΐνης. Όπως έχει αποδειχθεί για τις πρωτεΐνες ELAVL, δυνητικά η hnRNP1 θα μπορούσε να παρεμβαίνει στους βασικούς 3' παράγοντες επεξεργασίας που δεσμεύονται στις εγγύς θέσεις ματίσματος του 3'UTR της α-συνουκλεΐνης<sup>160</sup>. Η διάσπαση και η πολυαδενυλίωση απαιτούν τέσσερις cis-δρώντες αλληλουχίες στο 3'UTR. Η πρώτη αλληλουχία είναι σήμα πολυαδενυλίωσης (PAS) με την αλληλουχία AAUAAA ή AUUAAA 10-35 νουκλεοτίδια ανοδικά της θέσης διάσπασης. Οι CPSF30/CPSF4 και WDR33 του συμπλόκου του παράγοντα εξειδίκευσης πολυαδενυλίωσης (CPSF) αναγνωρίζουν και δεσμεύουν το PAS στη θέση διάσπασης, η οποία είναι συνήθως ένα δινουκλεοτίδιο CA. Οι πρωτεΐνες CSTF64/CSTF2 του συμπλόκου του παράγοντα διέγερσης της διάσπασης (CSTF) προσδένονται άμεσα στην πλούσια σε GU αλληλουχία επονομαζόμενη downstream sequence element (DSE) καθοδικά του PAS. Η αλληλεπίδραση CPSF-CSTF είναι ο πιο κρίσιμος παράγοντας στην επιλογή της θέσης διάσπασης. Το σύμπλοκο του παράγοντα διάσπασης I (CFIm), στο οποίο οι NUDT21/CPSF5 και CFIm68/CPSF6 συνδέονται στο mRNA, συνδέεται σε ένα στοιχείο ανοδικά του PAS που περιέχει νουκλεοτίδια U(G/A)UA, τα οποία με τη σειρά τους δύνανται να βοηθήσουν στην αναγνώριση της θέσης διάσπασης. Μια τέταρτη αλληλουχία, πλούσια σε νουκλεοτίδια G καθοδικά της DSE, μπορεί επίσης να εμπλέκεται στην πολυαδενυλίωση, αλλά η υπεύθυνη πρωτεΐνη ή πρωτεΐνες της δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί. Για να διερευνηθεί εάν η hnRNP1 παρεμβαίνει στη σύνδεση οποιουδήποτε από τα παραπάνω σύμπλοκα, ο βιοτινυλιωμένος ανιχνευτής SNCA-3'UTR<sub>2520</sub> (η παραγωγή του περιγράφηκε στην ενότητα 1.1) επώαστηκε με λύμα από κύτταρα SK-N-SH 48 ώρες έπειτα της διαμόλυνσής τους με αυξανόμενες ποσότητες πλασμιδίου προς υπερέκφραση της hnRNP1. Η αύξηση των επιπέδων hnRNP1 στα κύτταρα οδήγησε σε αυξημένη πρόσδεσή τους στον ανιχνευτή, σε αντιστοιχία με το πείραμα της ενότητας 2.1. Ωστόσο, η πρόσδεση των συμπλόκων CPSF, CSTF και CFIm δεν επηρεάστηκε, υποδεικνύοντας ότι η hnRNP1 δεν παρεμβαίνει στον μηχανισμό ΕΠΑ, τουλάχιστον σε αυτό το πειραματικό περιβάλλον (Εικόνα 19).

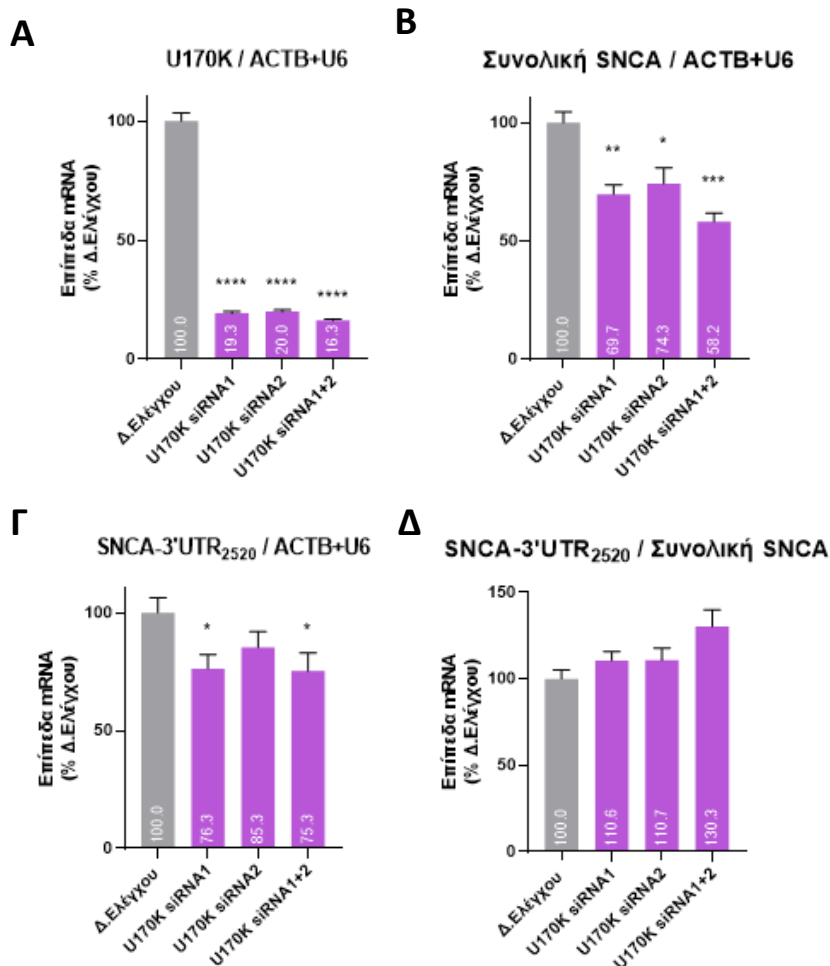


Εικόνα 19. Η hhRNPA1 δεν παρεμβαίνει άμεσα στον μηχανισμό εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης. Ανοσοσύπωμα κατά Western του ολικού και κατακρημισθέντος πρωτεϊνικού εκχυλίσματος έπειτα από ήπια ή έντονη υπερέκφραση hhRNPA1 σε κύτταρα SK-N-SH για 48 ώρες.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.8 Η hnRNP1 δεν συνεργάζεται με την U1snRNP προς επαγωγή εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης

Ένας εναλλακτικός μηχανισμός επαγωγής εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης είναι η πιθανή συνεργασία hnRNP1 με τον παράγοντα μηχανισμού U1 snRNP. Η hnRNP1 έχει δειχθεί πως αλληλοεπιδρά άμεσα με το U1 snRNP και την πρωτεΐνη U1-70K και η αποσιώπηση του U1 snRNA με τη χρήση αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων ενεργοποιεί κρυπτικές και εγγύς θέσεις πολυαδενυλίωσης<sup>161</sup>. Για να διερευνηθεί η συμμετοχή του σχηματισμού συμπλόκου hnRNP1-U1 snRNP στην ΕΠΑ της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, τα κύτταρα SK-N-SH διαμολύνθηκαν με δύο διαφορετικά siRNA που στόχευαν την U1-70K. Μετά από 48 ώρες, η ανάλυση RT-qPCR των εκχυλισμάτων RNA αποκάλυψε μείωση των επιπέδων mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης κατά 80% με οποιοδήποτε από τα δύο siRNA (Εικόνα 20Α). Ωστόσο, η αναλογία μακρών προς συνολικών μεταφράφων mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης παρουσίασε μη-σημαντική αύξηση 10% ( $p > 0,05$ ), υποδεικνύοντας ότι οι U1 snRNP / U1-70K δεν εμπλέκονται στην ΕΠΑ του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (Εικ.20Δ).



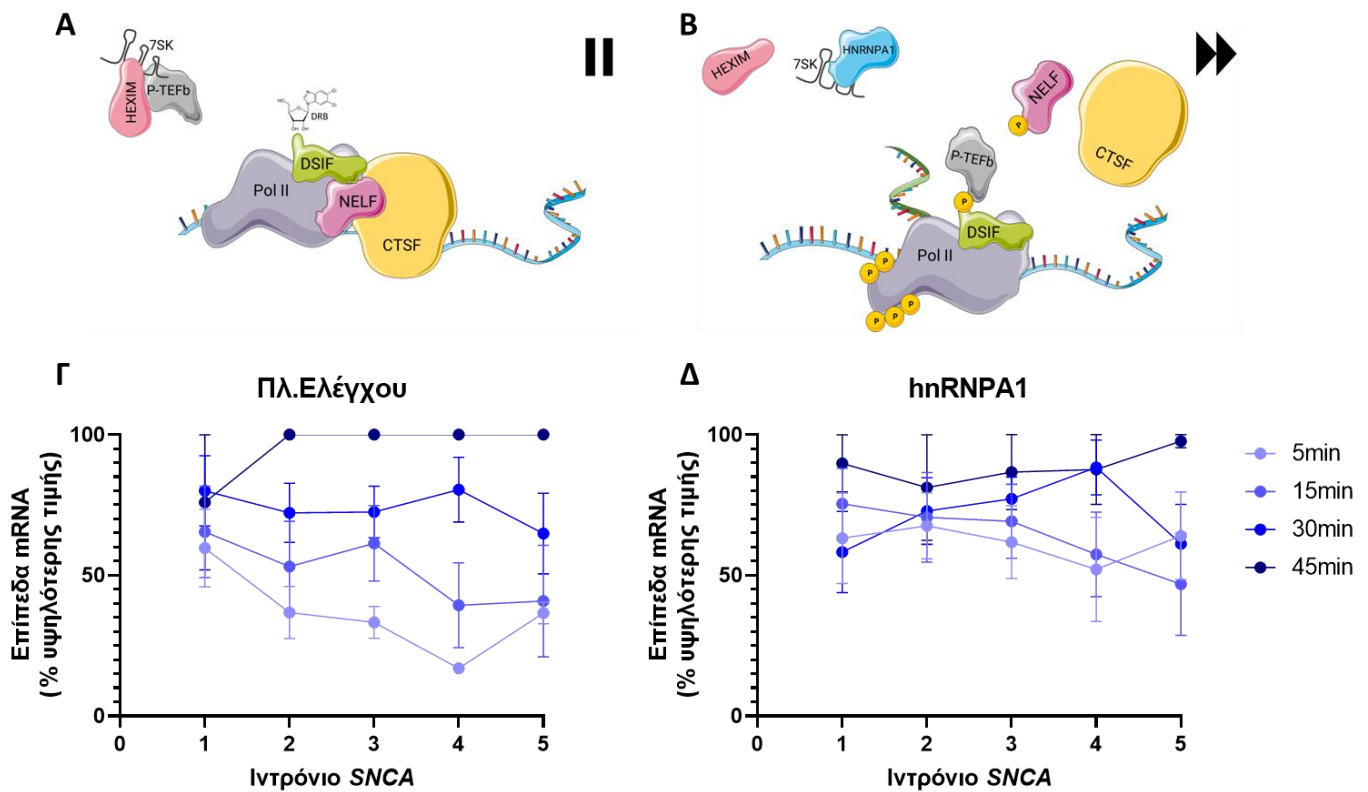
**Εικόνα 20.** Η hnRNP1 δεν συνεργάζεται με την U1snRNP προς επαγωγή εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης. Επίπεδα U170K mRNA (Α), όπως και συνολικού (Β), 3'UTR<sub>2520</sub> (Γ), λόγω 3'UTR<sub>2520</sub> προς συνολικό (Δ) mRNA  $\alpha$ -συνουκλεΐνης έπειτα από αποσιώπηση της U170K με χρήση αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων σε κύτταρα SK-N-SH για 48 ώρες. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=3, one-

way ANOVA,  $F=49.5(\mathbf{A})$ ,  $13.02(\mathbf{B})$ ,  $2.95(\mathbf{\Gamma})$ ,  $3.21(\mathbf{\Delta})$ , Tukey's test για της επιμέρους συγκρίσεις ( $*\leq 0.05$ ,  $**\leq 0.01$ ,  $***\leq 0.001$ ,  $****\leq 0.0001$ ).

### 2.9 Η hnRNPA1 επιταχύνει την RNA πολυμεράση II

Η ενίσχυση της συχνότητας παύσης της RNA πολυμεράσης II (Πολ II) είναι ένας ακόμη πιθανός μηχανισμός επαγωγής ΕΠΑ. Η Πολ II αποτελεί μέλος του συμπλόκου αναγνώρισης και τέλεσης της ΕΠΑ, και η μέση ταχύτητα της Πολ II παρουσιάζει αντίστροφη σχέση με την πιθανότητα ΕΠΑ. Πιθανολογείται πως η χρονικά ευαίσθητη σχέση της Πολ II με τις θέσεις ΕΠΑ αποτελεί μοχλό ρύθμισης της αναλογίας των ισομορφών, ώστε οι εγγύτερες θέσεις ΕΠΑ έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης καθώς τους δίνεται περισσότερος χρόνος για τον σχηματισμό του συμπλόκου πολυαδενυλίωσης, και αντίστοιχα η επιτάχυνση της Πολ II μπορεί να ευνοήσει απώτερες θέσεις ΕΠΑ. Η hnRNPA1 δεσμευόμενη στο 7SK RNA, αναστολέα της φωσφορυλιωμένης TEFb της επιτρέπει να επιταχύνει τη μεταγραφή (Εικόνα 21A, B). Για να διερευνηθεί εάν το hnRNPA1 επηρεάζει την ταχύτητα της μεταγραφής του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, κύτταρα SK-N-SH υπερέκφρασαν hnRNPA1 μέσω διαμόλυνσης για 48 ώρες και έπειτα εκτέθηκαν για δύο ώρες σε DRB, αναστρέψιμο αναστολέα της μεταγραφής ο οποίος αποτρέπει την πρόσδεση της P-TEFb στην Πολ II. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκτέθηκαν σε θρεπτικό ελεύθερο DRB και συλλέχθηκε ολικό RNA σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα από την άρση της αναστολής (5, 15, 30 και 45 λεπτά), το οποίο αναλύθηκε με RT-qPCR για τα ιντρόνια του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Ενώ τα κύτταρα SK-N-SH που διαμολύνθηκαν με το κενό πλασμίδιο εμφάνισαν αναμενόμενη προοδευτική αύξηση των μεταγράφων SNCA με την πάροδο του χρόνου, τα κύτταρα που υπερέκφρασαν hnRNPA1 παρουσίασαν μόνο οριακή αύξηση (Εικ. 21Γ, Δ). Το παρών υποδηλώνει πως η υπερέκφραση του hnRNPA1 διατήρησε υψηλά επίπεδα ελεύθερης P-TEFb στον πυρήνα, πιθανόν εμποδίζοντας την πρόσβαση του DRB στην Πολ II. Έτσι, παρά την αποτυχία ποσοτικής σύγκρισης των ρυθμών επιμήκυνσης της μεταγραφής, τα αποτελέσματα δείχνουν έμμεσα τον ρόλο του hnRNPA1 στην προώθηση της επιμήκυνσης και της παράκαμψης της εγγύς θέσεως ΕΠΑ.

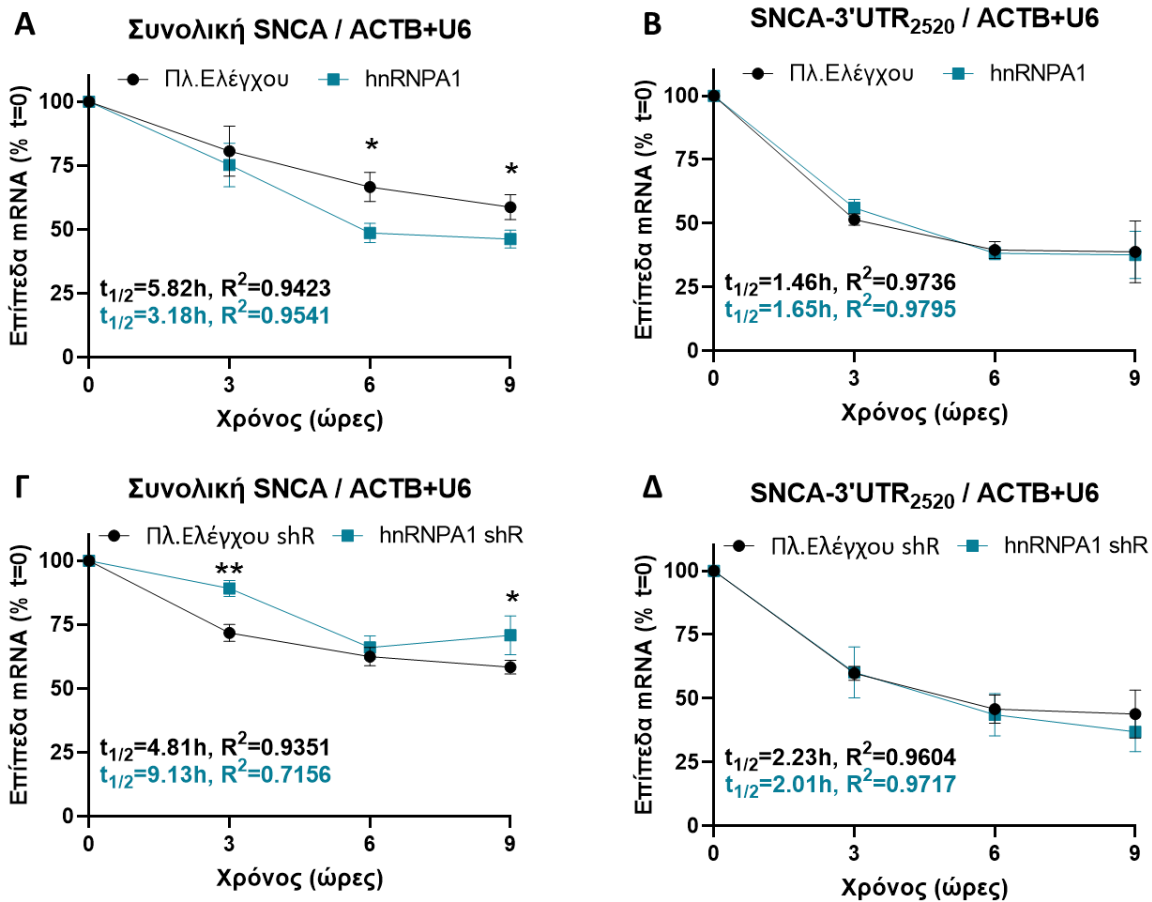
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



**Εικόνα 21.** Η hnRNP A1 επιταχύνει την RNA πολυμεράση II. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της DRB (Α), η δέσμευση του οποίου στην DSIF δεν αποτρέπει τη δράση της P-TEFb. Η hnRNP A1 δεσμεύεται στο 7SK, απελευθερώνοντας πρώην δεσμευμένη P-TEFb (Β). Μέτρηση της ανάκαμψης του μεταγραφικού μηχανισμού κυττάρων SK-N-SH μετά την άρση της αναστολής από την DRB με μέτρηση των επιπέδων ιντρονικού SNCA mRNA με RT-PCR είτε με ενδογενή επίπεδα hnRNP A1 (Γ) είτε μετά από υπερέκφραση hnRNP A1 (Δ).

### 2.10 Η hnRNP A1 αποσταθεροποιεί το mRNA της α-συνουκλεΐνης

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε ο μηχανισμός υπεύθυνος για την μείωση των συνολικών επιπέδων mRNA της α-συνουκλεΐνης. Κύτταρα SK-N-SH διαμολύνθηκαν με πλασμίδια κατάλληλα να υπερεκφράσουν ή να αποσιωπήσουν την hnRNP A1 για 48 ώρες και έπειτα εκτέθηκαν στον μη αναστρέψιμο αναστολέα της μεταγραφής ακτινομυκίνη D. Σε χρονικά διαστήματα 3, 6 και 9 ωρών, μαζί με την αρχική κατάσταση '0' ωρών συλλέχθηκε ολικό RNA και με χρήση RT-qPCR συγκρίθηκε ο χρόνος ημιζωής των μεταγράφων της α-συνουκλεΐνης. Η υπερέκφραση hnRNP A1 επέφερε μείωση στο χρόνο ημιζωής του συνολικού mRNA της α-συνουκλεΐνης, με την αποσιώπηση της hnRNP A1 να οδηγεί σε αυξημένη σταθερότητα του mRNA (Εικόνα 22Α,Β). Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως τα μεταγράφα με επίμηκες 3'UTR έμειναν ανεπηρέαστα των διακυμάνσεων hnRNP A1 (Εικ.22Γ,Δ), πιθανόν λόγω αυξημένης πυρηνικής τοποθέτησης (βλ. ενότητα 2.3) και αυξημένου αριθμού θέσεων πρόσδεσης ρυθμιστικών τρανς στοιχείων.



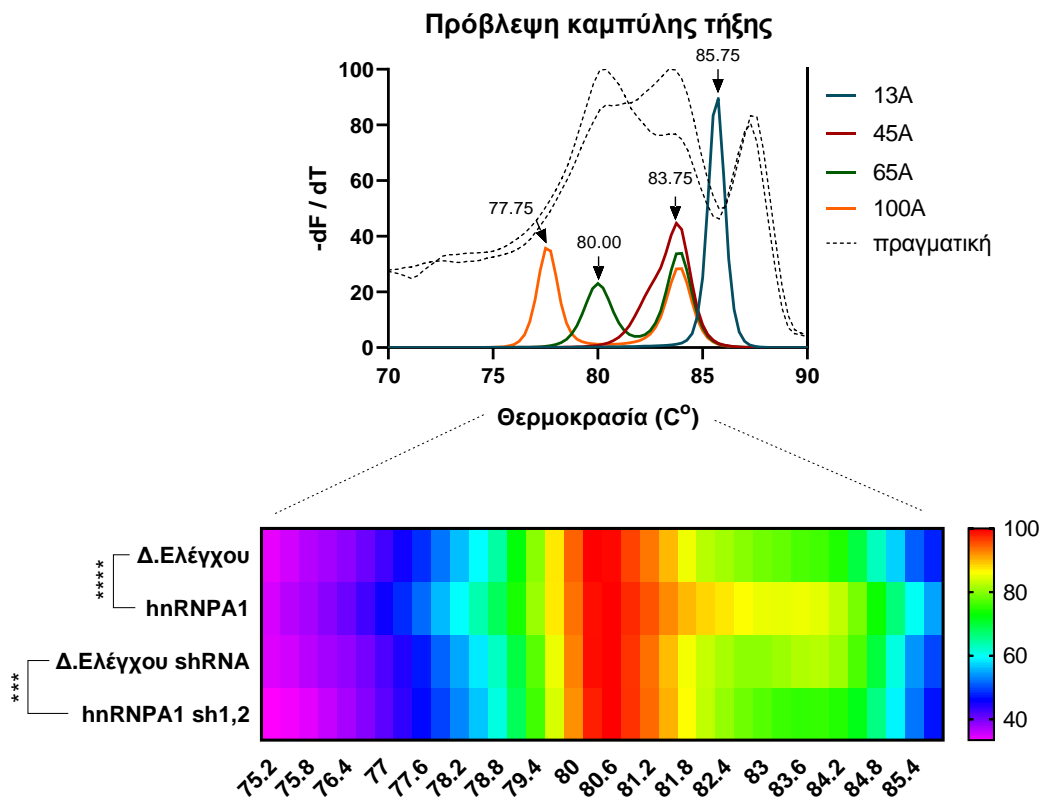
**Εικόνα 22.** Η hnRNPA1 αποσταθεροποιεί το mRNA της α-συνουκλεΐνης. Για την μέτρηση τα σταθερότητας του συνολικού (A, Γ) και 3'UTR<sub>2520</sub> (B, Δ) SNCA mRNA πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση (πάνω) ή αποσιώπηση (κάτω) της hnRNPA1 σε κύτταρα SK-N-SH μέσω διαμόλυνσης για 48 ώρες πριν την επώαση με ακτινομυκίνη D για 0, 3, 6 ή 9 ώρες. Τα επίπεδα mRNA ποσοτικοποιήθηκαν με RT-qPCR. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=5, μη γραμμική παλινδρόμηση (one phase decay,  $Y_0=100$ ), Student's t-test για τις επιμέρους συγκρίσεις (\* $\leq 0.05$ , \*\* $\leq 0.01$ ).



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.11 Η hnRNPA1 επάγει αποαδενυλίωση του mRNA της $\alpha$ -συνουκλεΐνης

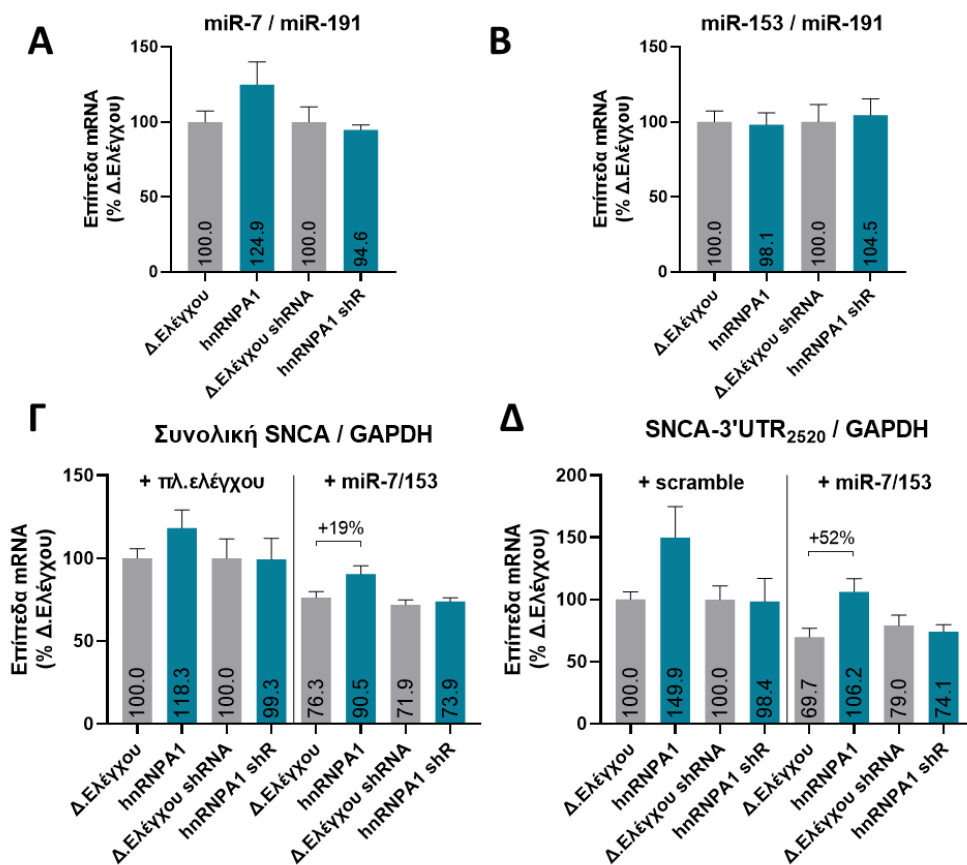
Οι μεταβολές στο μήκος της ουράς polyA έχουν αναγνωρισθεί εδώ και καιρό ως βασικό χαρακτηριστικό της μετάβασης μεταξύ σταθερότητας και αποικοδόμησης του mRNA. Για να ελεγχθεί η πιθανότητα επίδρασης της hnRNPA1 στην πολύ(A) ουρά των διαφόρων ισομορφών 3'UTR της συνουκλεΐνης πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία extension Poly(A) Test ή ePAT (βλ Μέθοδοι). Η υπερέκφραση του hnRNPA1 μετατόπισε τα προϊόντα PCR προς υψηλότερα T<sub>m</sub>, ενδεικτικά της μικρότερης πολύ(A) ουράς, ενώ η αποσιώπηση του hnRNPA1 μετατόπισε τα προϊόντα PCR προς χαμηλότερα T<sub>m</sub>, ενδεικτικά της μεγαλύτερης πολύ(A) ουράς (Εικόνα 23). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η hnRNPA1 μειώνει τα επίπεδα του mRNA SNCA αποσταθεροποιώντας το mRNA SNCA μέσω αποαδενυλίωσης.



**Εικόνα 23.** Η hnRNPA1 επάγει αποαδενυλίωση του mRNA της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Προσομοίωση καμπύλης τήξης των προϊόντων SNCA RT-qPCR με 13, 45, 65 ή 100 κατάλοιπα αδενοσίνης, όπως προβλέπεται από το uMeltQUARTZ. Όσο μικρότερη είναι η ουρά πολύ(A), τόσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία τήξης (πάνω). Πραγματικές καμπύλες τήξης των προϊόντων RT-qPCR μετά από υπερέκφραση ή αποσιώπηση της hnRNPA1 σε κύτταρα SK-N-SH μετά από 48 ώρες (κάτω). Two-way ANOVA, n=3, \*\*\*\*, Tukey's test για της επιμέρους συγκρίσεις Student's t-test (\*\*\* $\leq$ 0.001, \*\*\*\* $\leq$ 0.00001).

## 2.12 Η hnRNPA1 δεν ελέγχει το mRNA της α-συνουκλεΐνης μέσω miRNA

Έχει αποδειχθεί πως η hnRNPA1 επάγει την μεταγραφή ή και ωρίμανση ορισμένων miRNA<sup>162</sup>. Επομένως εξετάστηκε η πιθανότητα ενίσχυσης της παρουσίας ή της δράσης των miR-7 & miR-153, μόρια που ελέγχουν αρνητικά το mRNA της α-συνουκλεΐνης. Προς αυτό, πραγματοποιήθηκε ανάλυση RT-qPCR της έκφρασης των miR-7 και miR-153 σε RNA που απομονώθηκε από κύτταρα SK-N-SH διαμολυσμένα με τα πλασμίδια υπερέκφρασης ή αποσιώπησης του hnRNPA1. Η έκφραση των ώριμων miR-7 και miR-153 δεν επηρεάστηκε από τα επίπεδα του hnRNPA1 (Εικόνα 24Α,Β). Στη συνέχεια, ένα πλασμίδιο που συν-εκφράζει miR-7 και miR-153 διαμολύνθηκε ταυτόχρονα με τα πλασμίδια που υπερεκφράζουν ή αποσιωπούν το hnRNPA1 σε κύτταρα SK-N-SH. Σαράντα οκτώ ώρες αργότερα, η ανάλυση RT-qPCR της έκφρασης του mRNA της α-συνουκλεΐνης αποκάλυψε ότι η υπερέκφραση ή η αποσιώπηση του hnRNPA1 δεν άλλαξε την αποικοδόμηση των ολικών ή μακρών μεταγράφων SNCA με τη μεσολάβηση του miR-7/153 (Εικ.24Γ, Δ).

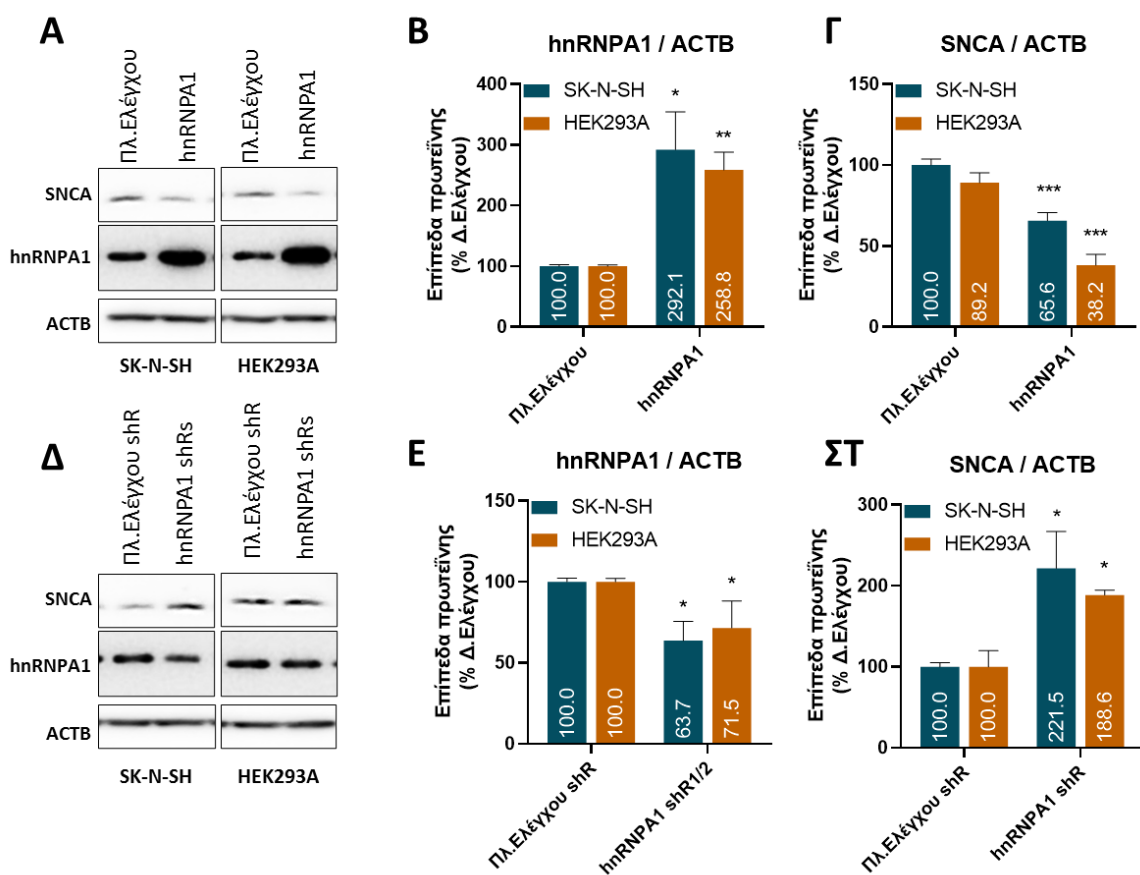


**Εικόνα 24. Η hnRNPA1 δεν ελέγχει το mRNA της α-συνουκλεΐνης μέσω miRNA.** Κύτταρα SK-N-SH συλλέχθηκαν 48 ώρες μετά την υπερέκφραση ή την αποσιώπηση του hnRNPA1 και τα επίπεδα των ώριμων miR-7 (Α) και miR-153 (Β) μετρήθηκαν με τη χρήση RT-qPCR. Σαράντα οκτώ ώρες μετά τη συν-διαμόλυνση κυττάρων SK-N-SH με πλασμίδιο που εκφράζει τόσο τον miR-7 όσο και τον miR-153 με πλασμίδια έκφρασης ή αποσιώπησης του hnRNPA1 μετρήθηκαν επίπεδα συνολικού (Γ) και 3'UTR<sub>2520</sub> (Δ) mRNA της α-συνουκλεΐνης με τη χρήση RT-qPCR. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=5, (Α, Β) one-way ANOVA, F=1.85 & 0.08 για Α & Β αντίστοιχα.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

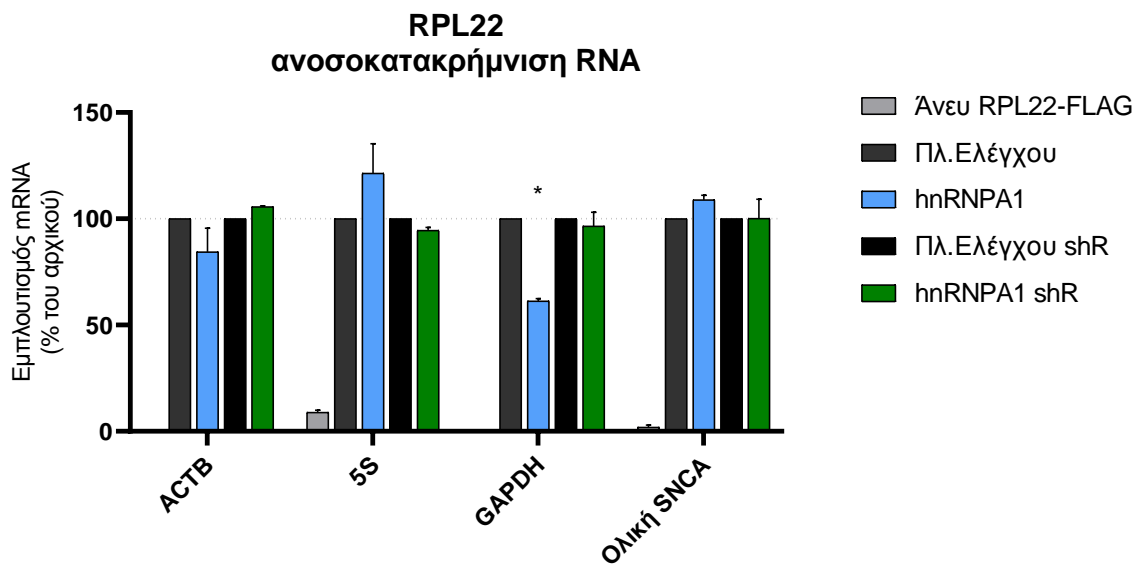
### 2.13 Η hnRNPA1 μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα α-συνουκλείνης

Σε επόμενο στάδιο διερευνήθηκε η επίδραση των επιπέδων hnRNPA1 στην πρωτεϊνική έκφραση α-συνουκλείνης. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα SK-N-SH και HEK293A στα οποία είχε προηγηθεί υπερέκφραση ή αποσιώπηση hnRNPA1 μέσω διαμόλυνσης με κατάλληλο πλασμίδιο για 48 ώρες αναλύθηκαν με ανοσοσύτρωμα κατά Western. Η υπερέκφραση hnRNPA1 επέφερε μείωση στα ενδογενή επίπεδα α-συνουκλείνης και στις δυο κυτταρικές σειρές της τάξης του 35% (Εικόνα 25Γ), δεδομένο το οποίο ακολουθεί την αντίστοιχη πτώση των συνολικών επιπέδων mRNA της α-συνουκλείνης. Απροσδόκητο ήταν το αποτέλεσμα της αποσιώπησης hnRNPA1, το οποίο οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων α-συνουκλείνης (Εικ.25ΣΤ), διότι παρ'όλο που η αποσιώπηση hnRNPA1 σταθεροποίησε τις mRNA της α-συνουκλείνης με βραχεία 3'UTR, είχε οδηγήσει σε μείωση των συνολικών επιπέδων mRNA.



**Εικόνα 25. Η hnRNPA1 μειώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα α-συνουκλείνης.** Υπερέκφραση και αποσιώπηση της hnRNPA1 σε κύτταρα SK-N-SH μέσω διαμόλυνσης για 48 ώρες πριν την απομόνωση πρωτεΐνης και ποσοτικοποίηση των επιπέδων με ανοσοσύτρωμα κατά Western στην περίπτωση της υπερέκφρασης (A) και αποσιώπησης (Δ) hnRNPA1. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων hnRNPA1 (B, E) και SNCA (Γ, ΣΤ). Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=6, Student's t-test, (\* $\leq$ 0.05, \*\* $\leq$ 0.01, \*\*\* $\leq$ 0.001).

2.14 Η hnRNPA1 δεν επηρεάζει τη συγγένεια mRNA της α-συνουκλεΐνης – ριβοσώματος  
 Για να διερευνησουμε την πιθανότητα ελέγχου της έκφρασης α-συνουκλεΐνης από την hnRNPA1 στο μεταφραστικό επίπεδο, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση RNA (RNA-IP) σε κύτταρα SK-N-SH τα οποία συν-διαμολύνθηκαν με πλασμίδια κατάλληλα για υπερέκφραση ή αποσιώπηση της hnRNPA1 ταυτόχρονα με πλασμίδιο το οποίο εκφράζει την πρωτεΐνη της 60S υπομονάδας του ριβοσώματος RPL22 με ένα επιπρόσθετο οκταπεπτίδιο ονομαζόμενο FLAG. Δύο ημέρες μετά τη διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση RNA με σφαιρίδια ρητίνης συζευγμένα με αντί-FLAG αντίσωμα. Στο εκχύλισμα RNA πραγματοποιήθηκε RT-qPCR για την εκτίμηση της ποσότητας mRNA της α-συνουκλεΐνης προσδεμένης στο ριβόσωμα. Η διακύμανση των επιπέδων hnRNPA1 δεν φάνηκε να μεταβάλλει την πρόσδεση του mRNA της α-συνουκλεΐνης στο ριβόσωμα (Εικόνα 26).



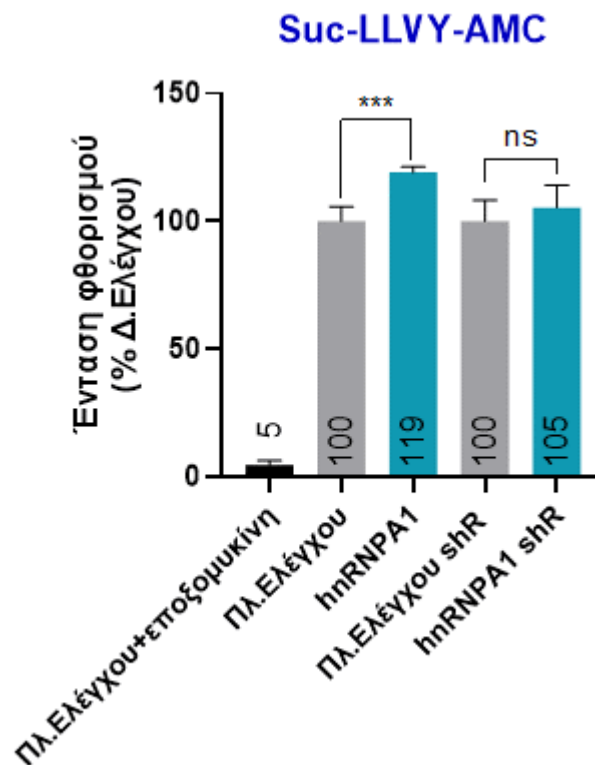
**Εικόνα 26. Η hnRNPA1 δεν επηρεάζει τη συγγένεια mRNA της α-συνουκλεΐνης – ριβοσώματος.**  
 Ανοσοκατακρήμιση RNA σε κύτταρα SK-N-SH έπειτα από υπερέκφραση ή αποσιώπηση hnRNPA1 ταυτόχρονα με υπερέκφραση της ριβοσωμικής πρωτεΐνης RPL22 σεσημασμένης με οκταπεπτίδιο FLAG για 48 ώρες. Τα επίπεδα mRNA γονιδίων ελέγχου, όπως και του mRNA της α-συνουκλεΐνης ποσοτικοποιήθηκαν με RT-qPCR. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=3, Student's t-test ( $*\leq 0.05$ ).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.15 Η hnRNPA1 επιδρά θετικά στην δραστηριότητα του πρωτεασώματος

Εν συνεχεία, διερευνήθηκε ο ρόλος της hnRNPA1 στον καταβολισμό της α-συνουκλεΐνης. Η SNCA αποδομείται τόσο από το μονοπάτι ουβικουϊτίνης-πρωτεασώματος όσο και από το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσσοσωμάτων το οποίο περιλαμβάνει την μακροαυτοφαγία, την μικροαυτοφαγία και την αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από σαπερόνες.

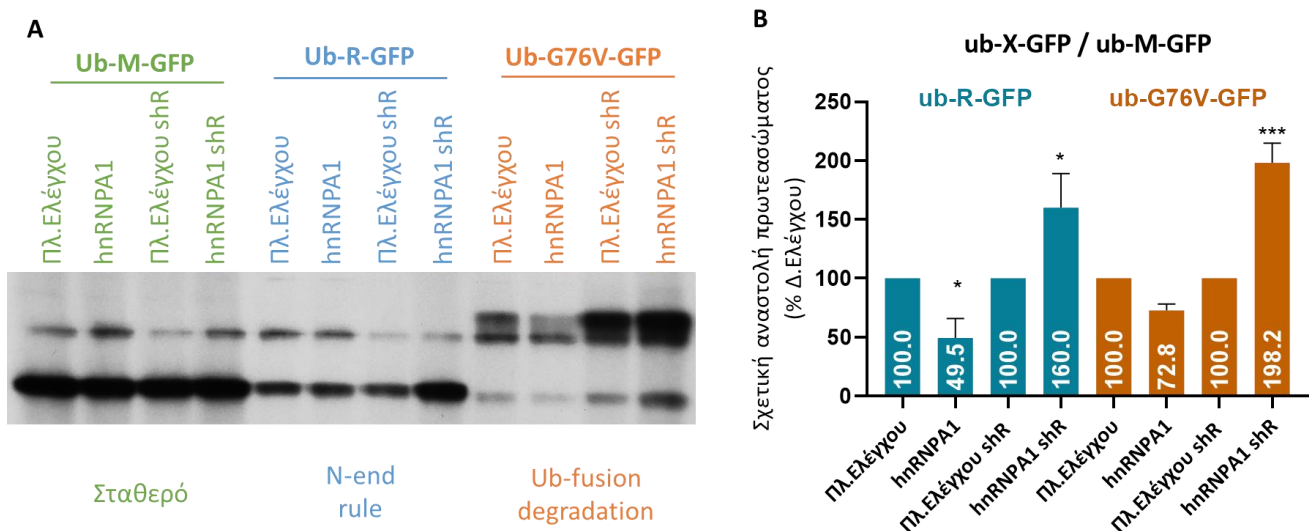
Αρχικά ελέγχθηκε η ενεργότητα χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος με χρήση του φθορίζοντος υποστρώματος Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-άμιδο-4-μεθυλοκουμαρίνη (Suc-LLVY-AMC). Το παρών πεπτίδιο αποτελεί το υπόστρωμα της υπομονάδας β5 του πρωτεασώματος, η πέψη του οποίου απελευθερώνει την 4-μεθυλοκουμαρίνη (AMC) προϊόν το οποίο εκπέμπει φθορισμό στα 460nm. Κύτταρα SK-N-SH διαμολύνθηκαν με πλασμίδια με σκοπό την υπερέκφραση ή αποσιώπηση της hnRNPA1 και έπειτα από 48 ώρες πραγματοποιήθηκε μη-αποδιατακτική λύση των κυττάρων και έκθεση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στο φθορίζον υπόστρωμα. Η υπερέκφραση hnRNPA1 αύξησε το βαθμό υδρόλυσης του υποστρώματος σε σύγκριση με τη συνθήκη ελέγχου (Εικόνα 27).



**Εικόνα 27.** Η hnRNPA1 επιδρά θετικά στην δραστηριότητα του πρωτεασώματος. Η 26S πρωτεασωμική δραστηριότητα δειγμάτων SK-N-SH μετά από υπερέκφραση ή αποσιώπηση hnRNPA1 για 48 ώρες προσδιορίστηκε με τη μέτρηση της διάσπασης του φθορίζον πεπτιδίου SLLVY-AMC. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=4, one-way ANOVA, F=228.4, Tukey's test για της επιμέρους συγκρίσεις (\*\*\*) $\leq$ 0.001).

## 2.16 Η hnRNPA1 επάγει τον καταβολισμό των ουβικουιτινωμένων πρωτεϊνών

Για την επαλήθευση των παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια τα οποία παράγουν χίμαιρες ουβικουιτίνης-GFP με παραλλαγές στην αμινοξική ακολουθία του συνδέτη. Το ub-M-GFP, χρησιμοποιείται ως πλασμίδιο ελέγχου καθώς η μεθειονίνη στη θέση 1 του συνδέτη του προσδίδει σταθερότητα σύμφωνα με το μοντέλο αποικοδόμησης βάσει του αμινοτελικού άκρου (N-end rule). Εν αντιθέσει, το ub-R-GFP αναμένεται να υπόκειται έντονη αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα και τέλος το ub-G76V-GFP περιέχει επαναλαμβανόμενες βαλίνες στις θέσεις -1 και 1 του συνδέτη οι οποίες αποτρέπουν την αποκόλληση της ουβικουιτίνης από το GFP. Η αδυναμία υδρόλυσης αποτελεί σηματοδότηση για αποικοδόμηση μέσα από το μονοπάτι προσδεδωμένης ουβικουιτίνης (Ubiquitin-fusion degradation pathway). Οπτικοποίηση και ποσοτικοποίηση των τετμημένων τμημάτων (X-GFP) και μετά κανονικοποίηση με βάση το ub-M-GFP δηλώνει την σχετική αναστολή του πρωτεασώματος. Τα παραπάνω συν-διαμολύνθηκαν σε SK-N-SH κύτταρα ταυτόχρονα με πλασμίδια κατάλληλα να προκαλέσουν υπερέκφραση ή αποσιώπηση της hnRNPA1. Ανοσοσύτρωμα κατά Western έδειξε μειωμένα επίπεδα χίμαιρας παρουσία hnRNPA1 της τάξης του (Εικόνα 28B). Η αποσιώπηση hnRNPA1 επέφερε το αντίστροφο αποτέλεσμα, το οποίο αντιστοιχεί σε αναστολή της δραστηριότητας του πρωτεασώματος.

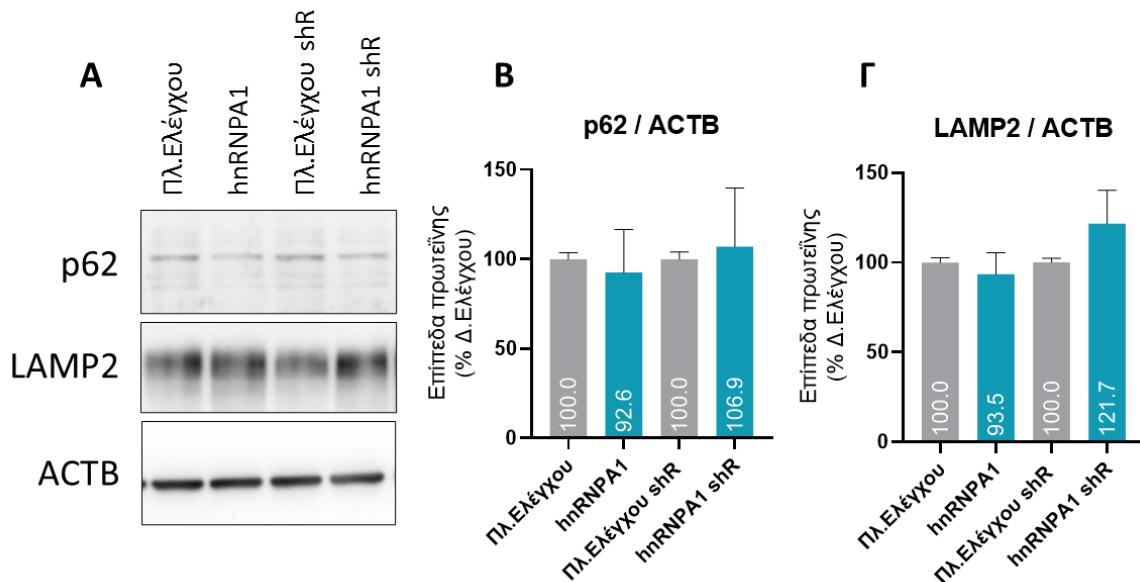


**Εικόνα 28. Η hnRNPA1 επάγει τον καταβολισμό των ουβικουιτινωμένων πρωτεϊνών.** Διαμόλυση κυττάρων SK-N-SH με τα πλασμίδια Ub-M-GFP (μεγάλος χρόνος ζωής, θετικός μάρτυρας διαμόλυσης) και τα Ub-R-GFP & Ub-G76V-GFP (αποικοδομούνται ταχέως από το πρωτεάσωμα) ταυτόχρονα με υπερέκφραση ή αποσιώπηση hnRNPA1. Απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος 48 ώρες μετά και ανοσοσύτρωμα κατά Western (**A**). Ποσοτικοποίηση των λόγων Ub-R-GFP / Ub-M-GFP & Ub-G76V-GFP / Ub-M-GFP (**B**). Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=3, one-way ANOVA, F=12.58, Tukey's test για της επιμέρους συγκρίσεις (\* $\leq$ 0.05, \*\*\* $\leq$ 0.001).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.17 Η hnRNPA1 δεν αλλάζει τα επίπεδα πρωτεϊνών της αυτοφαγίας

Παράλληλα με το πρωτεάσωμα, διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση της hnRNPA1 στον καταβολισμό της α-σνουκλείνης μέσα από το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσσωμάτων. Αρχικά, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης p62, η οποία ενσωματώνεται στα αυτοφαγώματα μέσα από αλληλεπίδραση με την LC3B και καταναλώνεται κατά την μακροαυτοφαγία, όπως και τα επίπεδα της LAMP2A, πρωτεΐνη ικανή να οδηγήσει στην στρατολόγηση πρωτεϊνών με το μοτίβο KFERQ, όπως η α-σνουκλείνη, στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Έπειτα από υπερέκφραση ή αποσιώπηση του hnRNPA1 μέσα από διαμόλυνση με πλασμίδια για 48 ώρες μετρήθηκαν τα επίπεδα των αναφερθέντων πρωτεϊνών με ανοσοσύτρωμα κατά Western. Διακύμανση στην έκφραση hnRNPA1 δεν επέφερε αλλαγή στα επίπεδα p62 και LAMP2 (Εικόνα 29B, Γ).



**Εικόνα 29. Η hnRNPA1 δεν αλλάζει τα επίπεδα πρωτεϊνών της αυτοφαγίας.** Την υπερέκφραση ή αποσιώπηση hnRNPA1 μέσω διαμόλυνσης κυττάρων SK-N-SH για 48 ώρες ακολούθησε απομόνωση πρωτεϊνών, οπτικοποίηση (A) και ποσοτικοποίηση των επιπέδων p62 (B) και LAMP2 (Γ) με ανοσοσύτρωμα κατά Western. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=4, one-way ANOVA, F=1.2(B), 0.09(Γ) Tukey's test για της επιμέρους συγκρίσεις.

### 2.18 Η hnRNPA1 εμπλέκεται στην αυτοφαγική ροή

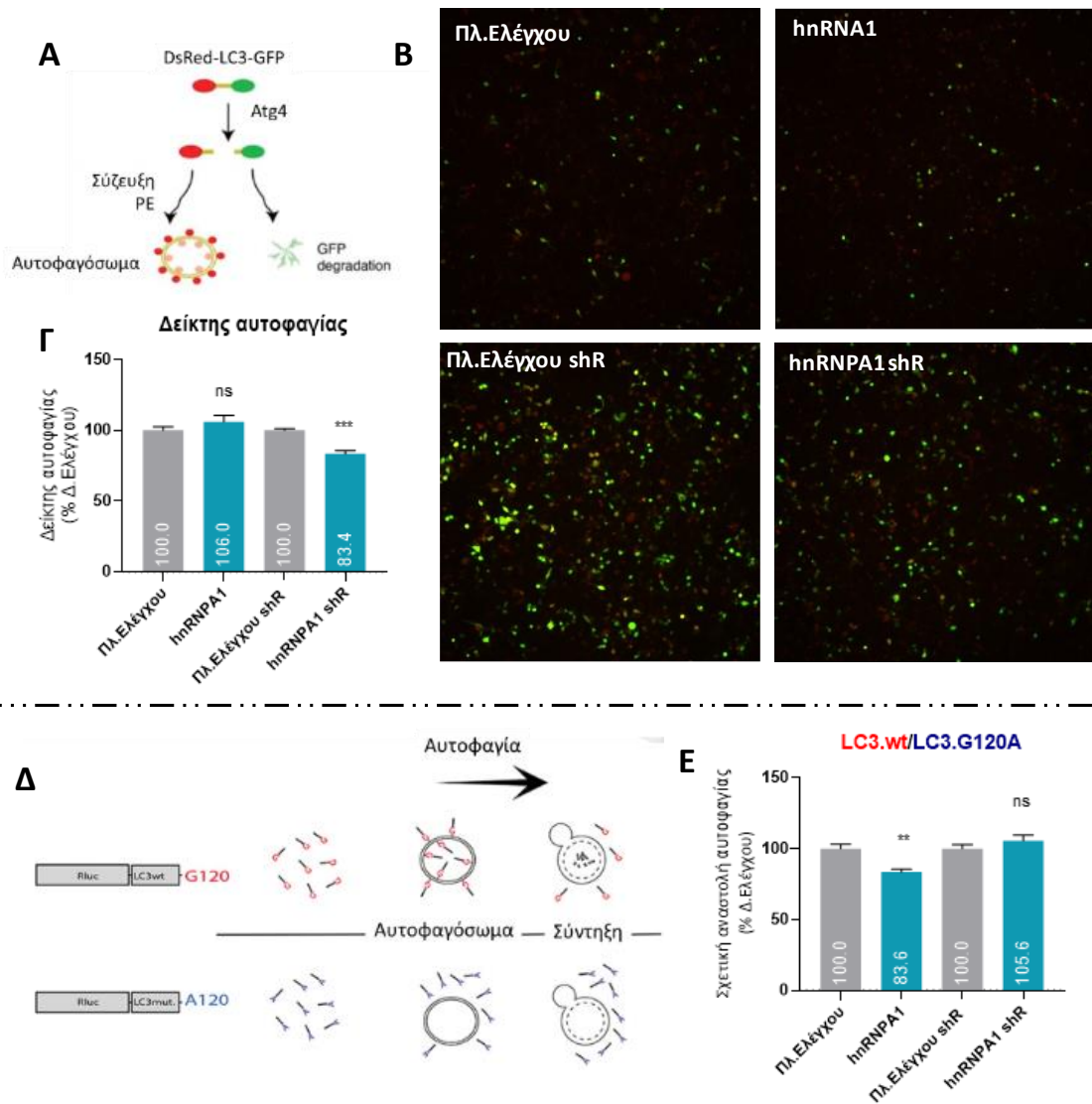
Ως εναλλακτική μέθοδο μέτρησης της αυτοφαγικής ροής, μελετήθηκε η επίδραση της διακύμανσης των επιπέδων hnRNPA1 στην κατανάλωση LC3. Η LC3 διασπάται ταχέως μετά τη σύνθεσή της από την ATG4 αφήνοντας μια καρβοξυτελική γλυκίνη. Το μόριο LC3-I που σχηματίζεται με αυτόν τον τρόπο βρίσκεται διάχυτο στο κυτταρόπλασμα, αλλά κατά την επαγωγή της αυτοφαγίας, η LC3-I μετατρέπεται σε LC3-II με τη σύζευξη της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE) στο C-τελικό άκρο. Αυτό το λιπίδιο χρησιμεύει ως άγκυρα που μεσολαβεί στη σύνδεση της LC3-II με το φαγοφόρο καθώς και με την εσωτερική και εξωτερική αυτοφαγοσωμική μεμβράνη. Μετά τη συγχώνευση με τα λυσοσώματα, η LC3-II στην εσωτερική μεμβράνη αποικοδομείται, ενώ η LC3-II στην εξωτερική μεμβράνη απολιπιδοποιείται και ανακυκλώνεται<sup>153</sup>. Με σκοπό την μελέτη της ροής LC3 χρησιμοποιήθηκαν δύο πλασμιδιακά συστήματα.

Στο πρώτο χρησιμοποιήθηκε η DsRed-LC3-GFP<sup>149</sup>, κατασκευή στην οποία οι φθορίζουσες πρωτεΐνες DsRed και GFP είναι συζευγμένες με την LC3 με τρόπο ώστε η DsRed να συνδέεται με το αμινοτελικό άκρο LC3 και η GFP με το καρβοξυτελικό. Έπειτα από την διάσπαση της LC3 στο καρβοξυτελικό από την ATG4 ισομοριακά σε DsRed-LC3 και GFP, το DsRed-LC3 ενσωματώνεται στα αυτοφαγοσώματα και μπορεί να χρησιμεύσει ως εσωτερικός έλεγχος φόρτωσης, ενώ το GFP αποικοδομείται από την αυτοφαγία (Εικόνα 30Α). Η αναλογία φθορισμού GFP/ DsRed μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αυτοφαγίας (πιο συγκεκριμένα ο δείκτης ορίζεται ως:  $100 \cdot (100 \cdot \text{GFP} / \text{DsRed})$ ). Υπερέκφραση και αποσιώπηση hnRNPA1 πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα με διαμόλυνση με πλασμίδιο παράγων DsRed-LC3-GFP σε κύτταρα SK-N-SH για 48 ώρες, μετά το πέρας των οποίων πραγματοποιήθηκε φθορομέτρηση. Ενώ η περίσσεια hnRNPA1 δεν επηρέασε την αυτοφαγία, η εξάντλησή της μείωσε την αυτοφαγική ροή (Εικ.30Γ).

Στο δεύτερο πλασμιδιακό σύστημα, χρησιμοποιούνται δύο διαμολυσμένοι κυτταρικοί πληθυσμοί. Η λουσιφεράση Renilla βρίσκεται συνδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο της LC3 είτε με την αγρίου τύπου γλυκίνη στο εκτεθειμένο καρβοξυτελικό άκρο (πειραματικός πληθυσμός LC3.wt) είτε με υποκατάσταση αδενίνης στην ίδια θέση (πληθυσμός ελέγχου LC3.G120A), μετάλλαξη η οποία δεν επιτρέπει την προθήκη φωσφατιδυλαιθανολαμίνης με αποτέλεσμα την μη πρόσδεση της LC3 στα αυτοφαγοσώματα<sup>150</sup> (Εικ.30Δ). Η αναλογία LC3.wt/LC3G120A χρησιμεύει ως δείκτης της αυτοφαγικής δραστηριότητας. Την διαμόλυνση κυττάρων SK-N-SH με τα παραπάνω πλασμίδια ταυτόχρονα με πλασμίδια κατάλληλα να προκαλέσουν υπερέκφραση ή αποσιώπηση της hnRNPA1 για 48 ώρες ακολούθησε μέτρηση της έντασης της χημιοφωταύγειας των Renilla-LC3. Υπερέκφραση hnRNPA1 επέφερε αύξηση της αυτοφαγικής ροής, ενώ η αποσιώπηση προκάλεσε μια ήπια μη στατιστικά σημαντική μείωση (Εικ.30Δ).



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



**Εικόνα 30. Η hnrRNA1 εμπλέκεται στην αυτοφαγική ροή. Α.** Μηχανισμός της πρωτεΐνης DsRed-LC3-GFP. Η χειμέρα DsRed-LC3 σηματοδοτεί την εξωτερική πλευρά των αυτοφαγοσωμάτων, ενώ η GFP αποικοδομείται μέσω αυτοφαγίας. **Β.** Μικροσκοπία φθορισμού κυττάρων SK-N-SH 48 ώρες μετά τη συν-διαμόλυνση με πλασμίδια ικανά να προκαλέσουν υπερέκφραση ή αποσιώπηση hnrRNA1 ταυτόχρονα με το πλασμίδιο DsRed-LC3-GFP. Ο λόγος της έντασης GFP προς DsRed-LC3 (**Γ**) αποτελεί δείκτη αυτοφαγίας. **Δ.** Αρχή λειτουργίας του συστήματος πλασμιδίων LC3.wt & LC3G120A. Ορισμένα από τα μόρια LC3.wt καταστρέφονται κατά τη διάρκεια της αυτοφαγίας με την πάροδο του χρόνου εν αντιθέσει με το LC3G120A το οποίο δεν ενσωματώνεται στα αυτοφαγοσώματα. Ο λόγος της έντασης LC3.wt προς LC3G120A (**Ε**) αποτελεί δείκτη αυτοφαγίας. Μέσος όρος  $\pm$ SD, n=4, one-way ANOVA, F=11.01(A), 9.64(B), Tukey's test για της επιμέρους συγκρίσεις (\*\* $\leq$ 0.01, \*\*\* $\leq$ 0.001).



# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## Συζήτηση

Η παρεκκλίνουσα έκφραση της SNCA αποτελεί θεμελιώδες χαρακτηριστικό σε μια σειρά από νόσων μεταξύ των οποίων της νόσου του Πάρκινσον (νΠ), της άνοιας με σωμάτια Lewy και της ατροφίας πολλαπλών συστημάτων, με κρίσιμο ρόλο στην έναρξη και επιδείνωση του νευροεκφυλισμού. Η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την έκφραση της SNCA είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη πιθανών θεραπευτικών παρεμβάσεων. Οι έως τώρα έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην διαλεύκανση της μεθόδου με την οποία ελαττώματα σε επιλεγμένα μονοπάτια ή καταβολικές διεργασίες όπως το πρωτεάσωμα και η αυτοφαγία οδηγούν σε μη φυσιολογική έκφραση της πρωτεΐνης SNCA. Μικρή προσοχή έχει δοθεί στα ανοδικά ρυθμιστικά σημεία που διαμορφώνουν τη μετάφραση του mRNA της α-συνουκλεΐνης. Προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο αποκάλυψε ότι η 5'UTR του SNCA mRNA είναι απαραίτητη για τη μετάφραση και περιέχει ένα στοιχείο εσωτερικής θέσης εισόδου στο ριβόσωμα (IRES) που επιτρέπει τη σύνθεση mRNA κατά τη διάρκεια του στρες, όταν τα περισσότερα mRNA απομονώνονται από τη μετάφραση<sup>149</sup>. Επιπλέον, μελέτες έχουν αναφέρει SNPs στο SNCA 3'UTR που συνδέονται με τη νΠ<sup>28,144-146</sup> και αλλαγές στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση του SNCA σε ασθενείς με νΠ<sup>28,147</sup>, αναδεικνύοντας τη συμβολή των ρυθμιστικών στοιχείων του SNCA 3'UTR στην έκφραση της πρωτεΐνης SNCA.

Οι RBPs επηρεάζουν πληθώρα λειτουργιών στον κύκλο ζωής του mRNA, από το μάτισμα και την εναλλακτική πολυαδενυλίωση, στην μεταφορά του mRNA εκτός του πυρήνα και περαιτέρω στην τοποθέτηση στο κύτταρο, την σταθερότητα την δυναμική κοκκίων στρες, ακόμη και τα επίπεδα μετάφρασης<sup>95,100</sup>. Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως μπορούν να επιφέρουν αντίθετα αποτελέσματα σε περιβάλλοντα όπου είναι ενεργά διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης. Αυτό μπορεί να προκληθεί από τη μεταβολή της σχετικής αφθονίας ή της δραστηριότητας των RBPs που συνδέονται στο ίδιο cis-στοιχείο. Έτσι, η λειτουργία ενός συγκεκριμένου cis-στοιχείου 3' UTR εξαρτάται από το "πλαίσιο", καθώς ο ανταγωνισμός και η συνεργατικότητα μεταξύ των RBPs θα καθορίσουν τελικά το λειτουργικό αποτέλεσμα ενός συγκεκριμένου 3' UTR<sup>101</sup>.

Το εξώνιο 6 του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης περιλαμβάνει εξ'ολοκλήρου το 3'UTR το οποίο με τη σειρά του μέσα από το μηχανισμό της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης είναι ικανό να παράγει πολλά διαφορετικά μήκη στο τελικό μετάγραφο. Πιο συγκεκριμένα έχουν αναγνωριστεί SNCA 3'UTR με μήκη 290, 480, 560, 1070 και 2520 βάσεων (Εισαγωγή-Εικόνα 3). Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν δυο κατηγορίες όσον αφορά το μήκος 3'UTR: το σύνολο των ισομορφών και η πιο επιμήκης ισομορφή με μήκος 2520 βάσεων για τους εξής λόγους: πρώτον, η ισομορφή 3'UTR<sub>2520</sub> εκτιμάται πως αποτελεί σημαντικό ποσοστό του συνόλου των ισομορφών, της τάξης του 30-40%<sup>28,29</sup>. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί διαφορές στη σχετική πληθώρα της παρούσας ισομορφής στους ασθενείς με Πάρκινσον σε σχέση με υγιή άτομα<sup>28</sup>, υπογραμμίζοντας την σημασία της στην εύρυθμη λειτουργία της βιολογίας της α-συνουκλεΐνης. Τέλος, όσον αφορά την ρύθμισή του 3'UTR από τις πρωτεΐνες AUF1 και hnRNP1, η 3'UTR<sub>2520</sub> ξεχωρίζει καθώς περιέχει έξι επαναλήψεις πλειοψηφικής (consensus) αλληλουχίας του στοιχείου πλούσιου σε AU (ARE), σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ισομορφές οι οποίες περιλαμβάνουν μεν ARE στοιχεία, μα με παραλλαγές στην ακολουθία. Πιθανολογήθηκε ως εκ τούτου πως η επιμηκέστερη ισομορφή δέχεται διαφορετική και εντονότερη ρυθμιστική πίεση από τις RBPs που μελετήθηκαν.

Η πρωτεΐνη AUF1 κατακρημνίστηκε με χρήση βιοτινυλιωμένων τμημάτων του *SNCA* mRNA (5'UTR, CDS, βραχύ 3'UTR, άπω 3'UTR) όπου βρέθηκε προοδεδεμένο στα τμήματα 3'UTR και απών από τις άλλες λειτουργικές περιοχές του mRNA. Στην περίπτωση της αυξημένης παρουσίας AUF1, βρέθηκε ικανή να μειώσει τα επίπεδα *SNCA* mRNA κατά 17% αφήνοντας ανεπηρέαστα τα επίπεδα 3'UTR<sub>2520</sub>. Η μείωση των συνολικών επιπέδων συνέπεσε με αποσταθεροποίηση των βραχέων ισομορφών του mRNA και μείωση του μέσου μήκους της πολύ(A) ουράς τους. Τα παραπάνω συνάδουν με ευρήματα σε άλλους στόχους της AUF1, στους οποίους έχει επίσης παρατηρηθεί ο αποσταθεροποιητικός ρόλος της AUF1, χωρίς όμως να έχει βρεθεί να επηρεάζει το βήμα στενωπό της διαδικασίας, την αποαδενυλίωση<sup>163,164</sup>. Περαιτέρω πειράματα κατακρήμνισης με βιοτινυλιωμένο RNA και συν-ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν πως η AUF1 στρατολογεί το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης CNOT1-CNOT7 στο mRNA της α-συνουκλεΐνης. Τέλος, αποτρέπει την πρόσδεση *SNCA* mRNA – ριβοσώματος, οδηγώντας συνολικά σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων α-συνουκλεΐνης κατά 35%.

Έκπληξη προκάλεσε αρχικά η παρατήρηση πως η αποσιώπηση AUF1 επέφερε μείωση των επιπέδων α-συνουκλεΐνης της τάξης του 35%, δεδομένου πως ανέβασε τα συνολικά επίπεδα mRNA της α-συνουκλεΐνης, όπως και της ισομορφής 3'UTR<sub>2520</sub>. Όχι μόνον αυτό, μα πρόσδωσε σταθερότητα στο βραχύ mRNA της α-συνουκλεΐνης και αύξησε το μέσο μήκος της πολύ(A) ουράς. Όμοια ευρήματα παρουσίασε ομάδα στην Ιαπωνία μελετώντας τον έλεγχο τον οποίο ασκεί η AUF1 στην *Creb1* μέσα από το 3'UTR του mRNA του. Πιο συγκεκριμένα, σε νευροβλαστικά κύτταρα μυός *Neuro-2A* βρήκαν πως η αποσιώπηση AUF1 μείωσε τα επίπεδα *CPEB1* mRNA, ανεβάζοντας ταυτόχρονα τα πρωτεϊνικά της επίπεδα<sup>165</sup>. Η επόμενη δημοσίευση της ομάδας υποστήριξε πως απουσία AUF1 τα miR-145a-5p και let-7b-5p εμπλέκονται στη ρύθμιση του *CPEB1* mRNA<sup>166</sup>. Η αλληλεπίδραση της AUF1 με τα miRNA έχει μελετηθεί εκτενώς, πρόσδεση του AUF1 σε επιλεγμένα miRNA ενισχύει τη συναρμολόγησή τους σε σύμπλοκα AGO2. Επιπλέον, η πρόσδεση του AUF1 σε στόχους mRNA μπορεί να ενισχύσει ή και να αναστείλει τη στρατολόγηση και τη λειτουργία του miRISC σε θέσεις-στόχους. Τέλος, ο AUF1 μπορεί να περιορίσει την παραγωγή miRNA καταστέλλοντας την έκφραση του DICER, ενώ παράλληλα ρυθμίζεται αμοιβαία ο ίδιος από επιλεγμένα miRNA<sup>106</sup>. Στην περίπτωσή μας ελέγχθηκε η αλληλεπίδραση της AUF1 με τους ισχυρούς αρνητικούς ρυθμιστές του mRNA της α-συνουκλεΐνης miR-7 και miR-153<sup>157</sup>. Χειραγώγηση των επιπέδων AUF1 άφησε ανεπηρέαστα τα επίπεδα των miRNAs και δεν έδειξε να συμμετέχει σε ανατροφοδοτικό κύκλο με αυτά στην αναστολή της έκφρασης α-συνουκλεΐνης.

Πιθανή εξήγηση για την παρακώλυση της πρωτεϊνοσύνθεσης α-συνουκλεΐνης απουσία AUF1 αποτελεί η εντονότατη συγκράτηση τόσο των βραχέων όσο και των επιμηκών ισομορφών mRNA της α-συνουκλεΐνης στον πυρήνα. Δεδομένης της έντονης πυρηνικής παρουσίας της AUF1 φαίνεται σημαντική για την έξοδο των mRNA της α-συνουκλεΐνης από τον πυρήνα.

Συνολικά, η ισορροπία των επιπέδων AUF1 φαίνεται απαραίτητη για την εύρυθμη λειτουργία των σημείων ελέγχου του κύκλου ζωής του mRNA της α-συνουκλεΐνης. Επιπλέον, η παρατήρηση αποαδενυλίωσης mRNA, όπως και η στρατολόγηση του συμπλέγματος CNOT1-CNOT7 αποτελούν άμεσες παρατηρήσεις ενός μηχανισμού δράσης της AUF1 οι οποίες έως τώρα είχαν μόνον υποτεθεί. Οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί ελέγχου του *SNCA* mRNA από την AUF1 χρήζει σίγουρα περαιτέρω διερεύνησης. Η AUF1 έχει δείχθει πως ανταγωνίζεται την HuR, μια ακόμη RBP εμπλεκόμενη στη σταθερότητα mRNA για τη δέσμευση σε συγκεκριμένα μοτίβα πλούσια σε U/AU

σε άλλους στόχους mRNA<sup>167,168</sup>. Ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η μελέτη της αλληλεπίδρασης των δυο ρυθμιστικών αυτών δυνάμεων καθώς η ισορροπία των μεταξύ τους επιπέδων δύναται να αποτελεί επιπλέον διάσταση στον έλεγχο της έκφρασης του SNCA.

Ομοίως με την AUF1 η hnRNP1 προσδένεται τόσο στο εγγύς όσο και στο άπω 3'UTR χωρίς να παρουσιάζει συγγένεια με τα 5'UTR και CDS, υποδεικνύοντας πως δύναται να ασκήσει έλεγχο σε όλες τις ισομορφές 3'UTR. Η βιβλιογραφική γνώση πως η hnRNP1 συμμετέχει στην έξοδο ορισμένων mRNA στόχων από τον πυρήνα<sup>169</sup> μας οδήγησε στη διερεύνηση της επιρροής της στην υποκυτταρική τοποθέτηση του mRNA της α-συνουκλείνης, όπου και βρέθηκε να παίζει πολυεπίπεδο ρόλο εξαρτώμενο από το μήκος του 3'UTR. Πιο συγκεκριμένα, η hnRNP1 οδήγησε σε παρατεταμένη παραμονή της 3'UTR<sub>2520</sub> ισομορφής στον πυρήνα (με την αποσιώπηση hnRNP1 να οδηγεί σε αυξημένη έξοδο του mRNA από αυτόν) και ευνόησε την παραμονή των πιο επιμήκων ισομορφών στο σώμα σε σχέση με τους νευράξονες σε μοντέλο κατεχολαμινεργικών κυττάρων, γεγονός που είχε αντίκτυπο και στα επίπεδα πρωτεΐνης. Δεδομένης της τοξικής επίδρασης της υπερβολικής α-συνουκλείνης στους νευρώνες, η λειτουργία της hnRNP1 ως ρυθμιστής της τοποθέτησης του mRNA και της πρωτεΐνης α-συνουκλείνης υποδεικνύει την ενδεχόμενη σημαντικότητά της στον νευροεκφυλισμό διαμεσολαβούμενο από α-συνουκλείνη.

Η hnRNP1 φάνηκε ρυθμιστής της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης (ΕΠΑ), με την υπερέκφρασή του να οδηγεί σε αύξηση της αναλογίας της μακριάς ισομορφής δια του συνόλου κατά 45%. Εξετάστηκαν τρεις πιθανοί μηχανισμοί που διέπουν την ΕΠΑ της α-συνουκλείνης, η παρεμβολή στους παράγοντες της επεξεργασίας του 3' άκρου στην περίπτωση της οποίας δεν βρέθηκε άμεση στρατολόγηση ή ανταγωνισμός με κάποιο εμπλεκόμενο σύμπλοκο, η συνεργασία με το συστατικό του συναρμωσώματος (spliceosome) U1 snRNP στην περίπτωση της οποίας δεν αποκαλύφθηκε συνεργατικότητα των δυο παραγόντων στο επίπεδο της ΕΠΑ και τέλος η ενίσχυση των παραγόντων επιμήκυνσης της μεταγραφής μέσω της προώθησης της πρόσδεσης του phospho-TEFb στην Pol II, μηχανισμός ο οποίος φάνηκε να είναι ο πιο πιθανός. Η αλληλεπίδραση της hnRNP1 με την Pol II πιθανόν να εξηγεί την μεταγραφική επαγωγή της α-συνουκλείνης που είδαμε στην περίπτωση υπερέκφρασης hnRNP1, κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί σε άλλα γονίδια στόχους στο παρελθόν<sup>170,171</sup>.

Ο διαφορικός έλεγχος των ισομορφών του mRNA της α-συνουκλείνης από την hnRNP1 αναγνωρίζεται και στο επίπεδο σταθερότητας του mRNA με την hnRNP1 να οδηγεί σε αποσταθεροποίηση των βραχέων ισομορφών, με μηχανισμό άγνωστο έως τώρα. Φαίνεται ανεξάρτητη της ρύθμισης μέσω των miR7 και miR153, πιθανολογείται πως συντελείται με εμπλοκή του συμπλόκου CNOT1-CNOT7 καθώς η hnRNP1 επέφερε αποαδενυλίωση χωρίς όμως να έχει βρεθεί άμεση αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο,

Η hnRNP1 έχει αναγνωρισθεί ως ρυθμιστής των διαδικασιών αποδόμησης και ανακύκλωσης πρωτεϊνών από την διαμεσολάβηση στην αποικοδόμηση της IκΒα μέσω πρωτεασώματος<sup>172</sup> έως την αναστολή της αυτοφαγίας σε περιπτώσεις αποσιώπησης της<sup>173</sup>. Επομένως, μελετήθηκε η επίδραση της στις παραπάνω διαδικασίες στο κυτταρικό μοντέλο νευροβλαστικών κυττάρων SK-N-SH, όπου βρέθηκε να ενισχύει την ενεργότητα χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος, τον καταβολισμό των ουβικουτινιλιωμένων πρωτεϊνών και να επιδρά θετικά στην αυτοφαγική ροή με την αποσιώπηση της να συνεπάγεται με επιβράδυνση των μηχανισμών πρωτεϊνικής καταστροφής. Η άμεση μείωση της συγγένειας SNCA mRNA - ριβοσώματος εξετάστηκε και φάνηκε πως δεν

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

αποτελεί σημείο ρύθμισης. Άθροισμα των παραπάνω συνισταμένων ήταν η πτώση των πρωτεϊνικών επιπέδων α-συνουκλεΐνης παρουσία hnRNPA1 και αύξησή τους απουσία hnRNPA1.

Συνολικά η hnRNPA1 αποτελεί πολυεπίπεδο ρυθμιστή της α-συνουκλεΐνης μέσα από το 3'UTR και μέσω του ρόλου της ως ρυθμιστή του πρωτεϊνικού καταβολισμού. Η hnRNPA1 φαίνεται να εμπλέκεται σε πολλαπλά στάδια στον κύκλο ζωής του mRNA της α-συνουκλεΐνης συμμετέχοντας στη ρύθμιση της μεταγραφής, της ΕΠΑ, της τοποθέτησης και το χρόνο ζωής των μεταγράφων ανάλογα με το μήκος 3'UTR. Επιπλέον, η hnRNPA1 φαίνεται ικανή και απαραίτητη να μετριάσει την υπερ-παραγωγή α-συνουκλεΐνης υπογραμμίζοντας τη σημασία της στη νΠ και τις α-συνουκλεϊνοπάθειες γενικότερα. Ωστόσο, λεπτομέρειες των μηχανισμών δράσης της hnRNPA1 αξίζει να εξακριβωθούν. Ο μηχανισμός της επαγωγής αποαδενυλίωσης από την hnRNPA1 παραμένει άγνωστος, όπως και η φύση της επιρροής της hnRNPA1 στη δυναμική κοκκίων επεξεργασίας και κοκκίων στρες τα οποία περιέχουν διαφορετικά μήκη 3'UTR της α-συνουκλεΐνης.

Εν κατακλείδι, η διερεύνηση των μηχανισμών εμπλεκόμενων στον έλεγχο της SNCA μέσα από το 3'UTR της από τις AUF1 / hnRNPA1 αποκάλυψε δυο σημαντικούς προμεταφραστικούς ρυθμιστές της και τόνισε την σημασία της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης στην εύρυθμη παραγωγή και παρουσία α-συνουκλεΐνης. Η χαρτογράφηση των αλληλεπιδράσεων των RBP με τα mRNA στόχους τους είναι σημαντική για την κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τη ρύθμιση μεταγράφων, την ισορροπία υγείας/παθογένειας και κατ' επέκταση προσθέτουν στην ανθρώπινη 'εργαλειοθήκη' για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.





# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## Βιβλιογραφία

1. Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14, 223–236; discussion 222. 10.1176/jnp.14.2.223.
2. de Lau, L.M., and Breteler, M.M. (2006). Epidemiology of Parkinson’s disease. *The Lancet Neurology* 5, 525–535. 10.1016/S1474-4422(06)70471-9.
3. Dexter, D.T., and Jenner, P. (2013). Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine* 62, 132–144. 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018.
4. Ascherio, A., and Schwarzschild, M.A. (2016). The epidemiology of Parkinson’s disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology* 15, 1257–1272. 10.1016/S1474-4422(16)30230-7.
5. Postuma, R.B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C.W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A.E., et al. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson’s disease. *Movement Disorders* 30, 1591–1601. 10.1002/mds.26424.
6. Tysnes, O.-B., and Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson’s disease. *J Neural Transm* 124, 901–905. 10.1007/s00702-017-1686-y.
7. Abbott, R.D., Petrovitch, H., White, L.R., Masaki, K.H., Tanner, C.M., Curb, J.D., Grandinetti, A., Blanchette, P.L., Popper, J.S., and Ross, G.W. (2001). Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson’s disease. *Neurology* 57, 456–462. 10.1212/wnl.57.3.456.
8. Haehner, A., Hummel, T., Hummel, C., Sommer, U., Junghanns, S., and Reichmann, H. (2007). Olfactory loss may be a first sign of idiopathic Parkinson’s disease. *Movement Disorders* 22, 839–842. 10.1002/mds.21413.
9. Janković, M., Svetel, M., and Kostić, V. (2015). Frequency of REM sleep behavior disorders in patients with Parkinson’s disease. *Vojnosanit Pregl* 72, 442–446. 10.2298/vsp130501006j.
10. Kalia, S.K., Sankar, T., and Lozano, A.M. (2013). Deep brain stimulation for Parkinson’s disease and other movement disorders. *Curr Opin Neurol* 26, 374–380. 10.1097/WCO.0b013e3283632d08.
11. Dickson, D.W., Braak, H., Duda, J.E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G.M., Hardy, J., Leverenz, J.B., Del Tredici, K., Wszolek, Z.K., et al. (2009). Neuropathological assessment of Parkinson’s disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 8, 1150–1157. 10.1016/S1474-4422(09)70238-8.
12. Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840. 10.1038/42166.
13. Goedert, M., Spillantini, M.G., Del Tredici, K., and Braak, H. (2013). 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* 9, 13–24. 10.1038/nrneurol.2012.242.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

14. Beach, T.G., Adler, C.H., Sue, L.I., Vedders, L., Lue, L., White Iii, C.L., Akiyama, H., Caviness, J.N., Shill, H.A., Sabbagh, M.N., et al. (2010). Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 119, 689–702. 10.1007/s00401-010-0664-3.
15. Hayes, M.T. (2019). Parkinson's Disease and Parkinsonism. *The American Journal of Medicine* 132, 802–807. 10.1016/j.amjmed.2019.03.001.
16. Savica, R., Cannon-Albright, L.A., and Pulst, S. (2016). Familial aggregation of Parkinson disease in Utah: A population-based analysis using death certificates. *Neurology Genetics* 2. 10.1212/NXG.0000000000000065.
17. Sveinbjörnsdóttir, S., Hicks, A.A., Jónsson, T., Pétursson, H., Guðmundsson, G., Frigge, M.L., Kong, A., Gulcher, J.R., and Stefánsson, K. (2000). Familial Aggregation of Parkinson's Disease in Iceland. *New England Journal of Medicine* 343, 1765–1770. 10.1056/NEJM200012143432404.
18. Lill, C.M. (2016). Genetics of Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Probes* 30, 386–396. 10.1016/j.mcp.2016.11.001.
19. Panicker, N., Ge, P., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2021). The cell biology of Parkinson's disease. *J Cell Biol* 220. 10.1083/jcb.202012095.
20. Hunn, B.H.M., Cragg, S.J., Bolam, J.P., Spillantini, M.-G., and Wade-Martins, R. (2015). Impaired intracellular trafficking defines early Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences* 38, 178–188. 10.1016/j.tins.2014.12.009.
21. Bae, E.-J., Kim, D.-K., Kim, C., Mante, M., Adame, A., Rockenstein, E., Ulusoy, A., Klinkenberg, M., Jeong, G.R., Bae, J.R., et al. (2018). LRRK2 kinase regulates  $\alpha$ -synuclein propagation via RAB35 phosphorylation. *Nat Commun* 9, 3465. 10.1038/s41467-018-05958-z.
22. Misgeld, T., and Schwarz, T.L. (2017). Mitostasis in Neurons: Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture. *Neuron* 96, 651–666. 10.1016/j.neuron.2017.09.055.
23. Cookson, M.R. (2012). Parkinsonism Due to Mutations in PINK1, Parkin, and DJ-1 and Oxidative Stress and Mitochondrial Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a009415. 10.1101/cshperspect.a009415.
24. Rocha, E.M., De Miranda, B., and Sanders, L.H. (2018). Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 109, 249–257. 10.1016/j.nbd.2017.04.004.
25. Milner, R., and Campbell, I.L. (2003). The Extracellular Matrix and Cytokines Regulate Microglial Integrin Expression and Activation1. *The Journal of Immunology* 170, 3850–3858. 10.4049/jimmunol.170.7.3850.
26. Sulzer, D., Alcalay, R.N., Garretti, F., Cote, L., Kanter, E., Agin-Liebes, J., Liang, C., McMurtrey, C., Hildebrand, W.H., Mao, X., et al. (2017). T cells from patients with Parkinson's disease recognize  $\alpha$ -synuclein peptides. *Nature* 546, 656–661. 10.1038/nature22815.
27. Mehra, S., Sahay, S., and Maji, S.K. (2019).  $\alpha$ -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1867, 890–908. 10.1016/j.bbapap.2019.03.001.

28. Rhinn, H., Qiang, L., Yamashita, T., Rhee, D., Zolin, A., Vanti, W., and Abeliovich, A. (2012). Alternative  $\alpha$ -synuclein transcript usage as a convergent mechanism in Parkinson's disease pathology. *Nat Commun* 3, 1084. 10.1038/ncomms2032.
29. Marchese, D., Botta-Orfila, T., Cirillo, D., Rodriguez, J.A., Livi, C.M., Fernández-Santiago, R., Ezquerra, M., Martí, M.J., Bechara, E., and Tartaglia, G.G. (2017). Discovering the 3' UTR-mediated regulation of alpha-synuclein. *Nucleic Acids Res* 45, 12888–12903. 10.1093/nar/gkx1048.
30. Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F., and George, J.M. (1998). Stabilization of  $\alpha$ -Synuclein Secondary Structure upon Binding to Synthetic Membranes\*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 9443–9449. 10.1074/jbc.273.16.9443.
31. Giasson, B.I., Murray, I.V.J., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2001). A Hydrophobic Stretch of 12 Amino Acid Residues in the Middle of  $\alpha$ -Synuclein Is Essential for Filament Assembly\*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 2380–2386. 10.1074/jbc.M008919200.
32. Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R., and Südhof, T.C. (2010).  $\alpha$ -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro. *Science* 329, 1663–1667. 10.1126/science.1195227.
33. Lautenschläger, J., Stephens, A.D., Fusco, G., Ströhl, F., Curry, N., Zacharopoulou, M., Michel, C.H., Laine, R., Nespovitaya, N., Fantham, M., et al. (2018). C-terminal calcium binding of  $\alpha$ -synuclein modulates synaptic vesicle interaction. *Nature Communications* 9. 10.1038/s41467-018-03111-4.
34. Oueslati, A., Fournier, M., and Lashuel, H.A. (2010). Chapter 7 - Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of  $\alpha$ -synuclein: Implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. In *Progress in Brain Research Recent Advances in Parkinson's Disease: Basic Research.*, A. Björklund and M. A. Cenci, eds. (Elsevier), pp. 115–145. 10.1016/S0079-6123(10)83007-9.
35. Kim, T.D., Paik, S.R., and Yang, C.-H. (2002). Structural and functional implications of C-terminal regions of  $\alpha$ -synuclein. *Biochemistry* 41, 13782–13790. 10.1021/bi026284c.
36. Fan, T.-S., Liu, S.C.-H., and Wu, R.-M. (2021). Alpha-Synuclein and Cognitive Decline in Parkinson Disease. *Life (Basel)* 11, 1239. 10.3390/life11111239.
37. Kahle, P.J., Neumann, M., Ozmen, L., Müller, V., Jacobsen, H., Schindzielorz, A., Okochi, M., Leimer, U., Putten, H. van der, Probst, A., et al. (2000). Subcellular Localization of Wild-Type and Parkinson's Disease-Associated Mutant  $\alpha$ -Synuclein in Human and Transgenic Mouse Brain. *J. Neurosci.* 20, 6365–6373. 10.1523/JNEUROSCI.20-17-06365.2000.
38. Fortin, D.L., Troyer, M.D., Nakamura, K., Kubo, S.-I., Anthony, M.D., and Edwards, R.H. (2004). Lipid rafts mediate the synaptic localization of  $\alpha$ -synuclein. *Journal of Neuroscience* 24, 6715–6723. 10.1523/JNEUROSCI.1594-04.2004.
39. Sharon, R., Goldberg, M.S., Bar-Josef, I., Betensky, R.A., Shen, J., and Selkoe, D.J. (2001).  $\alpha$ -synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9110–9115. 10.1073/pnas.171300598.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

40. Wislet-Gendebien, S., D'Souza, C., Kawarai, T., St George-Hyslop, P., Westaway, D., Fraser, P., and Tandon, A. (2006). Cytosolic Proteins Regulate  $\alpha$ -Synuclein Dissociation from Presynaptic Membranes\*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 32148–32155. 10.1074/jbc.M605965200.
41. Diao, J., Burré, J., Vivona, S., Cipriano, D.J., Sharma, M., Kyoung, M., Südhof, T.C., and Brunger, A.T. (2013). Native  $\alpha$ -synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2. *eLife* 2013. 10.7554/eLife.00592.
42. Soper, J.H., Roy, S., Stieber, A., Lee, E., Wilson, R.B., Trojanowski, J.Q., Burd, C.G., and Lee, V.M.-Y. (2008).  $\alpha$ -Synuclein-induced Aggregation of Cytoplasmic Vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *MBoC* 19, 1093–1103. 10.1091/mbc.e07-08-0827.
43. Lashuel, H.A., Overk, C.R., Oueslati, A., and Masliah, E. (2013). The many faces of  $\alpha$ -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci* 14, 38–48. 10.1038/nrn3406.
44. van Rooijen, B.D., Claessens, M.M.A.E., and Subramaniam, V. (2008). Membrane binding of oligomeric  $\alpha$ -synuclein depends on bilayer charge and packing. *FEBS Letters* 582, 3788–3792. 10.1016/j.febslet.2008.10.009.
45. Volles, M.J., Lee, S.-J., Rochet, J.-C., Shtilerman, M.D., Ding, T.T., Kessler, J.C., and Lansbury Jr., P.T. (2001). Vesicle permeabilization by protofibrillar  $\alpha$ -synuclein: Implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* 40, 7812–7819. 10.1021/bi0102398.
46. Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., and Kostka, M. (2007). Different species of  $\alpha$ -synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *Journal of Neuroscience* 27, 9220–9232. 10.1523/JNEUROSCI.2617-07.2007.
47. Kaye, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., and Glabe, C.G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486–489. 10.1126/science.1079469.
48. Karpinar, D.P., Baliya, M.B.G., Kügler, S., Opazo, F., Rezaei-Ghaleh, N., Wender, N., Kim, H.-Y., Taschenberger, G., Falkenburger, B.H., Heise, H., et al. (2009). Pre-fibrillar  $\alpha$ -synuclein variants with impaired  $\beta$ -structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *The EMBO Journal* 28, 3256–3268. 10.1038/emboj.2009.257.
49. Winner, B., Jappelli, R., Maji, S.K., Desplats, P.A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., et al. (2011). In vivo demonstration that  $\alpha$ -synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4194–4199. 10.1073/pnas.1100976108.
50. Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., Weir, D., Thompson, C., Szu-Tu, C., Trinh, J., et al. (2013). Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement Disorders* 28, 811–813. 10.1002/mds.25421.
51. Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., et al. (2003).  $\alpha$ -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science* 302, 841. 10.1126/science.1090278.

52. Guo, Y., Sun, Y., Song, Z., Zheng, W., Xiong, W., Yang, Y., Yuan, L., and Deng, H. (2021). Genetic Analysis and Literature Review of SNCA Variants in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 13, 648151. 10.3389/fnagi.2021.648151.
53. Barrett, P.J., and Timothy Greenamyre, J. (2015). Post-translational modification of  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *Brain Research* 1628, 247–253. 10.1016/j.brainres.2015.06.002.
54. Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002).  $\alpha$ -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4, 160–164. 10.1038/ncb748.
55. Anderson, J.P., Walker, D.E., Goldstein, J.M., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R.J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., et al. (2006). Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of  $\alpha$ -Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease\*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 29739–29752. 10.1074/jbc.M600933200.
56. Sugeno, N., Takeda, A., Hasegawa, T., Kobayashi, M., Kikuchi, A., Mori, F., Wakabayashi, K., and Itoyama, Y. (2008). Serine 129 Phosphorylation of  $\alpha$ -Synuclein Induces Unfolded Protein Response-mediated Cell Death\*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 23179–23188. 10.1074/jbc.M802223200.
57. Rieker, C., Dev, K.K., Lehnhoff, K., Barbieri, S., Ksiazek, I., Kauffmann, S., Danner, S., Schell, H., Boden, C., Ruegg, M.A., et al. (2011). Neuropathology in Mice Expressing Mouse Alpha-Synuclein. *PLOS ONE* 6, e24834. 10.1371/journal.pone.0024834.
58. Wakamatsu, M., Ishii, A., Ukai, Y., Sakagami, J., Iwata, S., Ono, M., Matsumoto, K., Nakamura, A., Tada, N., Kobayashi, K., et al. (2007). Accumulation of phosphorylated  $\alpha$ -synuclein in dopaminergic neurons of transgenic mice that express human  $\alpha$ -synuclein. *Journal of Neuroscience Research* 85, 1819–1825. 10.1002/jnr.21310.
59. Zhou, J., Broe, M., Huang, Y., Anderson, J.P., Gai, W.-P., Milward, E.A., Porritt, M., Howells, D., Hughes, A.J., Wang, X., et al. (2011). Changes in the solubility and phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein over the course of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 121, 695–704. 10.1007/s00401-011-0815-1.
60. Visanji, N.P., Wislet-Gendebien, S., Oschipok, L.W., Zhang, G., Aubert, I., Fraser, P.E., and Tandon, A. (2011). Effect of Ser-129 Phosphorylation on Interaction of  $\alpha$ -Synuclein with Synaptic and Cellular Membranes\*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 35863–35873. 10.1074/jbc.M111.253450.
61. Goldberg, A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895–899. 10.1038/nature02263.
62. Klionsky, D.J., and Emr, S.D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717–1721. 10.1126/science.290.5497.1717.
63. Sidransky, E., Samaddar, T., and Tayebi, N. (2009). Mutations in gba are associated with familial parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology* 73, 1424–1426. 10.1212/WNL.0b013e3181b28601.
64. Mazzulli, J.R., Xu, Y.-H., Sun, Y., Knight, A.L., McLean, P.J., Caldwell, G.A., Sidransky, E., Grabowski, G.A., and Krainc, D. (2011). Gaucher Disease Glucocerebrosidase and  $\alpha$ -Synuclein

- Form a Bidirectional Pathogenic Loop in Synucleinopathies. *Cell* 146, 37–52. 10.1016/j.cell.2011.06.001.
65. Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000). Age-related Decline in Chaperone-mediated Autophagy \*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 31505–31513. 10.1074/jbc.M002102200.
66. Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B.M., Avadhani, N.G., and Anandatheerthavarada, H.K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* 283, 9089–9100. 10.1074/jbc.M710012200.
67. Jensen, M.B., Bhatia, V.K., Jao, C.C., Rasmussen, J.E., Pedersen, S.L., Jensen, K.J., Langen, R., and Stamou, D. (2011). Membrane Curvature Sensing by Amphipathic Helices: A SINGLE LIPOSOME STUDY USING  $\alpha$ -SYNUCLEIN AND ANNEXIN B12\*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 42603–42614. 10.1074/jbc.M111.271130.
68. Middleton, E.R., and Rhoades, E. (2010). Effects of Curvature and Composition on  $\alpha$ -Synuclein Binding to Lipid Vesicles. *Biophysical Journal* 99, 2279–2288. 10.1016/j.bpj.2010.07.056.
69. Bayer, T.A., Jäkälä, P., Hartmann, T., Havas, L., McLean, C., Culvenor, J.G., Li, Q.-X., Masters, C.L., Falkai, P., and Beyreuther, K. (1999).  $\alpha$ -Synuclein accumulates in Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies but not in Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid plaque cores. *Neuroscience Letters* 266, 213–216. 10.1016/S0304-3940(99)00311-0.
70. Tsigelny, I.F., Sharikov, Y., Wrasidlo, W., Gonzalez, T., Desplats, P.A., Crews, L., Spencer, B., and Masliah, E. (2012). Role of  $\alpha$ -synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation. *The FEBS Journal* 279, 1000–1013. 10.1111/j.1742-4658.2012.08489.x.
71. Sanders, L.H., and Timothy Greenamyre, J. (2013). Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radical Biology and Medicine* 62, 111–120. 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.003.
72. Goedert, M., Falcon, B., Clavaguera, F., and Tolnay, M. (2014). Prion-like Mechanisms in the Pathogenesis of Tauopathies and Synucleinopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14, 495. 10.1007/s11910-014-0495-z.
73. Su, X., Maguire-Zeiss, K.A., Giuliano, R., Prifti, L., Venkatesh, K., and Federoff, H.J. (2008). Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* 29, 1690–1701. 10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.006.
74. Hoenen, C., Gustin, A., Birck, C., Kirchmeyer, M., Beaume, N., Felten, P., Grandbarbe, L., Heuschling, P., and Heurtaux, T. (2016). Alpha-Synuclein Proteins Promote Pro-Inflammatory Cascades in Microglia: Stronger Effects of the A53T Mutant. *PLOS ONE* 11, e0162717. 10.1371/journal.pone.0162717.
75. Liddelow, S.A., Guttonplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.-S., Peterson, T.C., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487. 10.1038/nature21029.
76. Cebrián, C., Zucca, F.A., Mauri, P., Steinbeck, J.A., Studer, L., Scherzer, C.R., Kanter, E., Budhu, S., Mandelbaum, J., Vonsattel, J.P., et al. (2014). MHC-I expression renders

- catecholaminergic neurons susceptible to T-cell-mediated degeneration. *Nat Commun* 5, 3633. 10.1038/ncomms4633.
77. Zhang, Y., Liu, L., Qiu, Q., Zhou, Q., Ding, J., Lu, Y., and Liu, P. (2021). Alternative polyadenylation: methods, mechanism, function, and role in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 40, 51. 10.1186/s13046-021-01852-7.
78. Guhaniyogi, J., and Brewer, G. (2001). Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* 265, 11–23. 10.1016/s0378-1119(01)00350-x.
79. Millevoi, S., and Vagner, S. (2010). Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic Acids Res* 38, 2757–2774. 10.1093/nar/gkp1176.
80. Turner, R.E., Pattison, A.D., and Beilharz, T.H. (2018). Alternative polyadenylation in the regulation and dysregulation of gene expression. *Semin Cell Dev Biol* 75, 61–69. 10.1016/j.semcd.2017.08.056.
81. Proudfoot, N.J., and Brownlee, G.G. (1976). 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 263, 211–214. 10.1038/263211a0.
82. Tian, B., Hu, J., Zhang, H., and Lutz, C.S. (2005). A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res* 33, 201–212. 10.1093/nar/gki158.
83. Rogers, J., Early, P., Carter, C., Calame, K., Bond, M., Hood, L., and Wall, R. (1980). Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain. *Cell* 20, 303–312. 10.1016/0092-8674(80)90616-9.
84. Setzer, D.R., McGrogan, M., Nunberg, J.H., and Schimke, R.T. (1980). Size heterogeneity in the 3' end of dihydrofolate reductase messenger RNAs in mouse cells. *Cell* 22, 361–370. 10.1016/0092-8674(80)90346-3.
85. Tian, B., and Manley, J.L. (2017). Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 18–30. 10.1038/nrm.2016.116.
86. Yuan, F., Hankey, W., Wagner, E.J., Li, W., and Wang, Q. (2021). Alternative polyadenylation of mRNA and its role in cancer. *Genes Dis* 8, 61–72. 10.1016/j.gendis.2019.10.011.
87. Chang, J.-W., Yeh, H.-S., and Yong, J. (2017). Alternative Polyadenylation in Human Diseases. *Endocrinol Metab* 32, 413–421. 10.3803/EnM.2017.32.4.413.
88. Arora, A., Goering, R., Lo, H.Y.G., Lo, J., Moffatt, C., and Taliaferro, J.M. (2022). The Role of Alternative Polyadenylation in the Regulation of Subcellular RNA Localization. *Frontiers in Genetics* 12.
89. Shi, Y., Di Giammartino, D.C., Taylor, D., Sarkeshik, A., Rice, W.J., Yates, J.R., Frank, J., and Manley, J.L. (2009). Molecular Architecture of the Human Pre-mRNA 3' Processing Complex. *Molecular Cell* 33, 365–376. 10.1016/j.molcel.2008.12.028.
90. Rügsegger, U., Beyer, K., and Keller, W. (1996). Purification and characterization of human cleavage factor Im involved in the 3' end processing of messenger RNA precursors. *J Biol Chem* 271, 6107–6113. 10.1074/jbc.271.11.6107.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

91. Cajigas, I.J., Tushev, G., Will, T.J., Dieck, S. tom, Fuerst, N., and Schuman, E.M. (2012). The Local Transcriptome in the Synaptic Neuropil Revealed by Deep Sequencing and High-Resolution Imaging. *Neuron* 74, 453–466. 10.1016/j.neuron.2012.02.036.
92. An, J.J., Gharami, K., Liao, G.-Y., Woo, N.H., Lau, A.G., Vanevski, F., Torre, E.R., Jones, K.R., Feng, Y., Lu, B., et al. (2008). Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* 134, 175–187. 10.1016/j.cell.2008.05.045.
93. Andreassi, C., Zimmermann, C., Mitter, R., Fusco, S., De Vita, S., Saiardi, A., and Riccio, A. (2010). An NGF-responsive element targets myo-inositol monophosphatase-1 mRNA to sympathetic neuron axons. *Nat Neurosci* 13, 291–301. 10.1038/nn.2486.
94. Nourse, J., Spada, S., and Danckwardt, S. (2020). Emerging Roles of RNA 3'-end Cleavage and Polyadenylation in Pathogenesis, Diagnosis and Therapy of Human Disorders. *Biomolecules* 10, 915. 10.3390/biom10060915.
95. Ravanidis, S., Kattan, F.-G., and Doxakis, E. (2018). Unraveling the Pathways to Neuronal Homeostasis and Disease: Mechanistic Insights into the Role of RNA-Binding Proteins and Associated Factors. *Int J Mol Sci* 19. 10.3390/ijms19082280.
96. Daubner, G.M., Cléry, A., and Allain, F.H.-T. (2013). RRM-RNA recognition: NMR or crystallography...and new findings. *Curr Opin Struct Biol* 23, 100–108. 10.1016/j.sbi.2012.11.006.
97. Nicastro, G., Taylor, I.A., and Ramos, A. (2015). KH-RNA interactions: back in the groove. *Curr Opin Struct Biol* 30, 63–70. 10.1016/j.sbi.2015.01.002.
98. Nguyen, C.D., Mansfield, R.E., Leung, W., Vaz, P.M., Loughlin, F.E., Grant, R.P., and Mackay, J.P. (2011). Characterization of a family of RanBP2-type zinc fingers that can recognize single-stranded RNA. *J Mol Biol* 407, 273–283. 10.1016/j.jmb.2010.12.041.
99. Gleghorn, M.L., and Maquat, L.E. (2014). “Black sheep” that don't leave the double-stranded RNA-binding domain fold. *Trends Biochem Sci* 39, 328–340. 10.1016/j.tibs.2014.05.003.
100. Doxakis, E. (2014). RNA binding proteins: a common denominator of neuronal function and dysfunction. *Neuroscience Bulletin* 30, 610–626. 10.1007/s12264-014-1443-7.
101. Mayr, C. (2017). Regulation by 3'-Untranslated Regions. *Annu Rev Genet* 51, 171–194. 10.1146/annurev-genet-120116-024704.
102. Moore, A.E., Chenette, D.M., Larkin, L.C., and Schneider, R.J. (2014). Physiological networks and disease functions of RNA-binding protein AUF1. *WIREs RNA* 5, 549–564. 10.1002/wrna.1230.
103. White, E.J.F., Brewer, G., and Wilson, G.M. (2013). Post-transcriptional control of gene expression by AUF1: Mechanisms, physiological targets, and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1829, 680–688. 10.1016/j.bbagr.2012.12.002.
104. White, E.J.F., Matsangos, A.E., and Wilson, G.M. (2017). AUF1 regulation of coding and noncoding RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8, 10.1002/wrna.1393. 10.1002/wrna.1393.
105. Chen, C.Y., Gherzi, R., Ong, S.E., Chan, E.L., Raijmakers, R., Pruijn, G.J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., and Karin, M. (2001). AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464. 10.1016/s0092-8674(01)00578-5.

106. Abdelmohsen, K., Tominaga-Yamanaka, K., Srikantan, S., Yoon, J.-H., Kang, M.-J., and Gorospe, M. (2012). RNA-binding protein AUF1 represses Dicer expression. *Nucleic Acids Res* 40, 11531–11544. 10.1093/nar/gks930.
107. Gruber, A.R., Fallmann, J., Kratochvill, F., Kovarik, P., and Hofacker, I.L. (2011). AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. *Nucleic Acids Res* 39, D66–69. 10.1093/nar/gkq990.
108. Lu, J.-Y., Sadri, N., and Schneider, R.J. (2006). Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs. *Genes Dev* 20, 3174–3184. 10.1101/gad.1467606.
109. Sadri, N., and Schneider, R.J. (2009). AUF1/HnRNPd-deficient mice develop pruritic inflammatory skin disease. *J Invest Dermatol* 129, 657–670. 10.1038/jid.2008.298.
110. Gouble, A., Grazide, S., Meggetto, F., Mercier, P., Delsol, G., and Morello, D. (2002). A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNPd overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res* 62, 1489–1495.
111. Al-Ansari, M.M., Hendrayani, S.F., Shehata, A.I., and Aboussekhra, A. (2013). p16(INK4A) represses the paracrine tumor-promoting effects of breast stromal fibroblasts. *Oncogene* 32, 2356–2364. 10.1038/onc.2012.270.
112. Pende, A., Tremmel, K.D., DeMaria, C.T., Blaxall, B.C., Minobe, W.A., Sherman, J.A., Bisognano, J.D., Bristow, M.R., Brewer, G., and Port, J. (1996). Regulation of the mRNA-binding protein AUF1 by activation of the beta-adrenergic receptor signal transduction pathway. *J Biol Chem* 271, 8493–8501. 10.1074/jbc.271.14.8493.
113. Dobi, A., Szemes, M., Lee, C., Palkovits, M., Lim, F., Gyorgy, A., Mahan, M.A., and Agoston, D.V. (2006). AUF1 is expressed in the developing brain, binds to AT-rich double-stranded DNA, and regulates enkephalin gene expression. *J Biol Chem* 281, 28889–28900. 10.1074/jbc.M511858200.
114. Lee, C., Gyorgy, A., Maric, D., Sadri, N., Schneider, R.J., Barker, J.L., Lawson, M., and Agoston, D.V. (2008). Members of the NuRD chromatin remodeling complex interact with AUF1 in developing cortical neurons. *Cereb Cortex* 18, 2909–2919. 10.1093/cercor/bhn051.
115. Liu, Q., Zhu, D., Li, N., Chen, S., Hu, L., Yu, J., and Xiong, Y. (2023). Regulation of LRRK2 mRNA stability by ATIC and its substrate AICAR through ARE-mediated mRNA decay in Parkinson's disease. *EMBO J* 42, e113410. 10.15252/embj.2022113410.
116. Kamma, H., Portman, D.S., and Dreyfuss, G. (1995). Cell type-specific expression of hnRNP proteins. *Exp Cell Res* 221, 187–196. 10.1006/excr.1995.1366.
117. He, Y., and Smith, R. (2009). Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B. *Cell Mol Life Sci* 66, 1239–1256. 10.1007/s00018-008-8532-1.
118. Casas-Finet, J.R., Smith, J.D., Kumar, A., Kim, J.G., Wilson, S.H., and Karpel, R.L. (1993). Mammalian heterogeneous ribonucleoprotein A1 and its constituent domains. Nucleic acid interaction, structural stability and self-association. *J Mol Biol* 229, 873–889. 10.1006/jmbi.1993.1093.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

119. Mayeda, A., Munroe, S.H., Xu, R.M., and Krainer, A.R. (1998). Distinct functions of the closely related tandem RNA-recognition motifs of hnRNP A1. *RNA* 4, 1111–1123. 10.1017/s135583829898089x.
120. Hamilton, B.J., Nagy, E., Malter, J.S., Arrick, B.A., and Rigby, W.F. (1993). Association of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and C proteins with reiterated AUUUA sequences. *Journal of Biological Chemistry* 268, 8881–8887. 10.1016/S0021-9258(18)52955-0.
121. Burd, C. g., and Dreyfuss, G. (1994). RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *The EMBO Journal* 13, 1197–1204. 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06369.x.
122. Nadler, S.G., Merrill, B.M., Roberts, W.J., Keating, K.M., Lisbin, M.J., Barnett, S.F., Wilson, S.H., and Williams, K.R. (1991). Interactions of the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein and its proteolytic derivative, UP1, with RNA and DNA: evidence for multiple RNA binding domains and salt-dependent binding mode transitions. *Biochemistry* 30, 2968–2976. 10.1021/bi00225a034.
123. Hudson, J.S., Ding, L., Le, V., Lewis, E., and Graves, D. (2014). Recognition and binding of human telomeric G-quadruplex DNA by unfolding protein 1. *Biochemistry* 53, 3347–3356. 10.1021/bi500351u.
124. Matthew Michael, W., Choi, M., and Dreyfuss, G. (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: A signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 83, 415–422. 10.1016/0092-8674(95)90119-1.
125. Clarke, J.P., Thibault, P.A., Salapa, H.E., and Levin, M.C. (2021). A Comprehensive Analysis of the Role of hnRNP A1 Function and Dysfunction in the Pathogenesis of Neurodegenerative Disease. *Frontiers in Molecular Biosciences* 8.
126. Fukuda, H., Katahira, M., Tsuchiya, N., Enokizono, Y., Sugimura, T., Nagao, M., and Nakagama, H. (2002). Unfolding of quadruplex structure in the G-rich strand of the minisatellite repeat by the binding protein UP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12685–12690. 10.1073/pnas.152456899.
127. Paramasivam, M., Membrino, A., Cogoi, S., Fukuda, H., Nakagama, H., and Xodo, L.E. (2009). Protein hnRNP A1 and its derivative Up1 unfold quadruplex DNA in the human KRAS promoter: implications for transcription. *Nucleic Acids Res* 37, 2841–2853. 10.1093/nar/gkp138.
128. Ghosh, M., and Singh, M. (2018). RGG-box in hnRNPA1 specifically recognizes the telomere G-quadruplex DNA and enhances the G-quadruplex unfolding ability of UP1 domain. *Nucleic Acids Res* 46, 10246–10261. 10.1093/nar/gky854.
129. Suzuki, H., and Matsuoka, M. (2017). hnRNPA1 autoregulates its own mRNA expression to remain non-cytotoxic. *Mol Cell Biochem* 427, 123–131. 10.1007/s11010-016-2904-x.
130. Bonnal, S., Pileur, F., Orsini, C., Parker, F., Pujol, F., Prats, A.-C., and Vagner, S. (2005). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *J Biol Chem* 280, 4144–4153. 10.1074/jbc.M411492200.

131. Buxadé, M., Parra, J.L., Rousseau, S., Shpiro, N., Marquez, R., Morrice, N., Bain, J., Espel, E., and Proud, C.G. (2005). The Mnks are novel components in the control of TNF alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1. *Immunity* 23, 177–189. 10.1016/j.immuni.2005.06.009.
132. Duan, Y., Du, A., Gu, J., Duan, G., Wang, C., Gui, X., Ma, Z., Qian, B., Deng, X., Zhang, K., et al. (2019). PARylation regulates stress granule dynamics, phase separation, and neurotoxicity of disease-related RNA-binding proteins. *Cell Res* 29, 233–247. 10.1038/s41422-019-0141-z.
133. Michlewski, G., Guil, S., and Cáceres, J.F. (2010). Stimulation of pri-miR-18a Processing by hnRNP A1. In *Regulation of microRNAs Advances in Experimental Medicine and Biology.*, H. Großhans, ed. (Springer US), pp. 28–35. 10.1007/978-1-4419-7823-3\_3.
134. Michlewski, G., and Cáceres, J.F. (2010). Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1011–1018. 10.1038/nsmb.1874.
135. Roy, R., Durie, D., Li, H., Liu, B.-Q., Skehel, J.M., Mauri, F., Cuorvo, L.V., Barbareschi, M., Guo, L., Holcik, M., et al. (2014). hnRNPA1 couples nuclear export and translation of specific mRNAs downstream of FGF-2/S6K2 signalling. *Nucleic Acids Res* 42, 12483–12497. 10.1093/nar/gku953.
136. Li, Z., Chen, K., Jiang, P., Zhang, X., Li, X., and Li, Z. (2014). CD44v/CD44s expression patterns are associated with the survival of pancreatic carcinoma patients. *Diagn Pathol* 9, 79. 10.1186/1746-1596-9-79.
137. Kress, E., Baydoun, H.H., Bex, F., Gazzolo, L., and Duc Dodon, M. (2005). Critical role of hnRNP A1 in HTLV-1 replication in human transformed T lymphocytes. *Retrovirology* 2, 8. 10.1186/1742-4690-2-8.
138. Gui, H., Lu, C.-W., Adams, S., Stollar, V., and Li, M.-L. (2010). hnRNP A1 interacts with the genomic and subgenomic RNA promoters of Sindbis virus and is required for the synthesis of G and SG RNA. *Journal of Biomedical Science* 17, 59. 10.1186/1423-0127-17-59.
139. Kim, H.J., Kim, N.C., Wang, Y.-D., Scarborough, E.A., Moore, J., Diaz, Z., MacLea, K.S., Freibaum, B., Li, S., Molliex, A., et al. (2013). Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 495, 467–473. 10.1038/nature11922.
140. Beusch, I., Barraud, P., Moursy, A., Cléry, A., and Allain, F.H.-T. (2017). Tandem hnRNP A1 RNA recognition motifs act in concert to repress the splicing of survival motor neuron exon 7. *Elife* 6, e25736. 10.7554/eLife.25736.
141. Donev, R., Newall, A., Thome, J., and Sheer, D. (2007). A role for SC35 and hnRNPA1 in the determination of amyloid precursor protein isoforms. *Mol Psychiatry* 12, 681–690. 10.1038/sj.mp.4001971.
142. Liu, Y., Kim, D., Choi, N., Oh, J., Ha, J., Zhou, J., Zheng, X., and Shen, H. (2020). hnRNP A1 Regulates Alternative Splicing of Tau Exon 10 by Targeting 3' Splice Sites. *Cells* 9, 936. 10.3390/cells9040936.
143. Park, S.J., Lee, H., Jo, D.S., Jo, Y.K., Shin, J.H., Kim, H.B., Seo, H.M., Rubinsztein, D.C., Koh, J.-Y., Lee, E.K., et al. (2015). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 post-transcriptionally

- regulates Drp1 expression in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1849, 1423–1431. 10.1016/j.bbagr.2015.10.017.
144. Cardo, L.F., Coto, E., de Mena, L., Ribacoba, R., Lorenzo-Betancor, O., Pastor, P., Samaranch, L., Mata, I.F., Díaz, M., Moris, G., et al. (2012). A search for SNCA 3' UTR variants identified SNP rs356165 as a determinant of disease risk and onset age in Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.* 47, 425–430. 10.1007/s12031-011-9669-1.
145. Pan, F., Dong, H., Ding, H., Ye, M., Liu, W., Wu, Y., Zhang, X., Chen, Z., Luo, Y., and Ding, X. (2012). SNP rs356219 of the  $\alpha$ -synuclein (SNCA) gene is associated with Parkinson's disease in a Chinese Han population. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, 632–634. 10.1016/j.parkreldis.2012.01.025.
146. Sotiriou, S., Gibney, G., Baxevas, A.D., and Nussbaum, R.L. (2009). A single nucleotide polymorphism in the 3'UTR of the SNCA gene encoding alpha-synuclein is a new potential susceptibility locus for Parkinson disease. *Neurosci. Lett.* 461, 196–201. 10.1016/j.neulet.2009.06.034.
147. Locascio, J.J., Eberly, S., Liao, Z., Liu, G., Hoising, A.N., Duong, K., Trisini-Lipsanopoulos, A., Dhima, K., Hung, A.Y., Flaherty, A.W., et al. (2015). Association between  $\alpha$ -synuclein blood transcripts and early, neuroimaging-supported Parkinson's disease. *Brain* 138, 2659–2671. 10.1093/brain/awv202.
148. Dantuma, N.P., Lindsten, K., Glas, R., Jellne, M., and Masucci, M.G. (2000). Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. *Nat Biotechnol* 18, 538–543. 10.1038/75406.
149. Sheen, J.-H., Zoncu, R., Kim, D., and Sabatini, D.M. (2011). Defective Regulation of Autophagy upon Leucine Deprivation Reveals a Targetable Liability of Human Melanoma Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer Cell* 19, 613–628. 10.1016/j.ccr.2011.03.012.
150. Farkas, T., and Jäättelä, M. (2017). Chapter One - Renilla Luciferase-LC3 Based Reporter Assay for Measuring Autophagic Flux. In *Methods in Enzymology Molecular Characterization of Autophagic Responses, Part B.*, L. Galluzzi, J. M. Bravo-San Pedro, and G. Kroemer, eds. (Academic Press), pp. 1–13. 10.1016/bs.mie.2016.09.072.
151. Sandler, H., Kreth, J., Timmers, H.T.M., and Stoecklin, G. (2011). Not1 mediates recruitment of the deadenylase Caf1 to mRNAs targeted for degradation by tristetraprolin. *Nucleic Acids Res* 39, 4373–4386. 10.1093/nar/gkr011.
152. Jänicke, A., Vancuylenberg, J., Boag, P.R., Traven, A., and Beilharz, T.H. (2012). ePAT: A simple method to tag adenylated RNA to measure poly(A)-tail length and other 3' RACE applications. *RNA* 18, 1289–1295. 10.1261/rna.031898.111.
153. Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., and Kominami, E. (2005). Lysosomal Turnover, but Not a Cellular Level, of Endogenous LC3 is a Marker for Autophagy. *Autophagy* 1, 84–91. 10.4161/auto.1.2.1697.
154. Chen, T.-M., Hsu, C.-H., Tsai, S.-J., and Sun, H.S. (2010). AUF1 p42 isoform selectively controls both steady-state and PGE2-induced FGF9 mRNA decay. *Nucleic Acids Res* 38, 8061–8071. 10.1093/nar/gkq717.

155. Koukouraki, P., and Doxakis, E. (2016). Constitutive translation of human  $\alpha$ -synuclein is mediated by the 5'-untranslated region. *Open Biol* 6. 10.1098/rsob.160022.
156. Lin, J.-Y., Li, M.-L., and Brewer, G. (2014). mRNA Decay Factor AUF1 Binds the Internal Ribosomal Entry Site of Enterovirus 71 and Inhibits Virus Replication. *PLoS One* 9, e103827. 10.1371/journal.pone.0103827.
157. Doxakis, E. (2010). Post-transcriptional Regulation of  $\alpha$ -Synuclein Expression by mir-7 and mir-153. *J Biol Chem* 285, 12726–12734. 10.1074/jbc.M109.086827.
158. Fragkouli, A., Koukouraki, P., Vlachos, I.S., Paraskevopoulou, M.D., Hatzigeorgiou, A.G., and Doxakis, E. (2017). Neuronal ELAVL proteins utilize AUF-1 as a co-partner to induce neuron-specific alternative splicing of APP. *Sci Rep* 7. 10.1038/srep44507.
159. Yoon, J.-H., De, S., Srikantan, S., Abdelmohsen, K., Grammatikakis, I., Kim, J., Kim, K.M., Noh, J.H., White, E.J.F., Martindale, J.L., et al. (2014). PAR-CLIP analysis uncovers AUF1 impact on target RNA fate and genome integrity. *Nat Commun* 5, 5248. 10.1038/ncomms6248.
160. Zhu, H., Zhou, H.-L., Hasman, R.A., and Lou, H. (2007). Hu proteins regulate polyadenylation by blocking sites containing U-rich sequences. *J. Biol. Chem.* 282, 2203–2210. 10.1074/jbc.M609349200.
161. Kaida, D., Berg, M.G., Younis, I., Kasim, M., Singh, L.N., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2010). U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature* 468, 664–668. 10.1038/nature09479.
162. Dos Santos, M.G.P., Gatti da Silva, G.H., Nagasse, H.Y., Fuziwara, C.S., Kimura, E.T., and Coltri, P.P. (2022). hnRNP A1 and hnRNP C associate with miR-17 and miR-18 in thyroid cancer cells. *FEBS Open Bio* 12, 1253–1264. 10.1002/2211-5463.13409.
163. Brewer, G. (1991). An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol* 11, 2460–2466.
164. Lu, J.-Y., Bergman, N., Sadri, N., and Schneider, R.J. (2006). Assembly of AUF1 with eIF4G–poly(A) binding protein complex suggests a translation function in AU-rich mRNA decay. *RNA* 12, 883–893. 10.1261/rna.2308106.
165. Oe, S., Koike, T., Hirahara, Y., Tanaka, S., Hayashi, S., Nakano, Y., Kase, M., Noda, Y., Yamada, H., and Kitada, M. (2021). AUF1, an mRNA decay factor, has a discordant role in Cpeb1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 534, 491–497. 10.1016/j.bbrc.2020.11.054.
166. Oe, S., Hayashi, S., Tanaka, S., Koike, T., Hirahara, Y., Kakizaki, R., Sakamoto, S., Noda, Y., Yamada, H., and Kitada, M. (2022). Cpeb1 expression is post-transcriptionally regulated by AUF1, CPEB1, and microRNAs. *FEBS Open Bio* 12, 82–94. 10.1002/2211-5463.13286.
167. Fotinos, A., Fritz, D.T., Lisica, S., Liu, Y., and Rogers, M.B. (2016). Competing Repressive Factors Control Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) in Mesenchymal Cells. *J Cell Biochem* 117, 439–447. 10.1002/jcb.25290.
168. Sun, S., Zhang, X., Lyu, L., Li, X., Yao, S., and Zhang, J. (2016). Autotaxin Expression Is Regulated at the Post-transcriptional Level by the RNA-binding Proteins HuR and AUF1. *J Biol Chem* 291, 25823–25836. 10.1074/jbc.M116.756908.

## BIBΛIOΓPAΦIA

169. Chiu, H.-C., Huang, W., Wang, Y.-Y., Li, J., Liao, T.-L., Nielsen, B.L., and Liu, H.-J. (2019). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 and Lamin A/C Modulate Nucleocytoplasmic Shuttling of Avian Reovirus p17. *J Virol* 93, e00851-19. 10.1128/JVI.00851-19.
170. Das, S., Ward, S.V., Markle, D., and Samuel, C.E. (2004). DNA damage-binding proteins and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 function as constitutive KCS element components of the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase promoter. *J Biol Chem* 279, 7313–7321. 10.1074/jbc.M312585200.
171. Chen, H., Hewison, M., Hu, B., and Adams, J.S. (2003). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) binding to hormone response elements: a cause of vitamin D resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6109–6114. 10.1073/pnas.1031395100.
172. Sahu, I., Sangith, N., Ramteke, M., Gadre, R., and Venkatraman, P. (2014). A novel role for the proteasomal chaperone PSMD9 and hnRNPA1 in enhancing IκBα degradation and NF-κB activation – functional relevance of predicted PDZ domain–motif interaction. *The FEBS Journal* 281, 2688–2709. 10.1111/febs.12814.
173. Kuranaga, Y., Sugito, N., Shinohara, H., Tsujino, T., Taniguchi, K., Komura, K., Ito, Y., Soga, T., and Akao, Y. (2018). SRSF3, a Splicer of the PKM Gene, Regulates Cell Growth and Maintenance of Cancer-Specific Energy Metabolism in Colon Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 3012. 10.3390/ijms19103012.





# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

## Περίληψη

Η πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη (SNCA) έχει συσχετιστεί κυρίως με το κεντρικό νευρικό σύστημα, εντοπίζεται κυρίως στις προσυναπτικές απολήξεις των νευρώνων και θεωρείται σημαντική για τη συναπτική πλαστικότητα και την κυψελιδική συσκευασία και διακίνηση. Αν και η λειτουργία της δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως, πιστεύεται ότι ρυθμίζει την ποσότητα των συναπτικών κυστίτιδων που προσδένονται στη σύναψη κατά την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών. Μη φυσιολογική έκφραση της SNCA αποτελεί θεμελιώδες χαρακτηριστικό σε μια σειρά νόσων μεταξύ των οποίων της νόσου του Πάρκινσον (νΠ), της άνοιας με σωματίδια Lewy και της ατροφίας πολλαπλών συστημάτων, με κρίσιμο ρόλο στην έναρξη και επιδείνωση του νευροεκφυλισμού. Η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν την έκφραση της SNCA είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη πιθανών θεραπευτικών παρεμβάσεων. Η ερευνητική δραστηριότητα έως τώρα έχει επικεντρωθεί στις διεργασίες λανθασμένης αναδίπλωσης και συσσώρευσης της πρωτεΐνης με μικρή προσοχή να έχει δοθεί στα ρυθμιστικά δίκτυα που διαμορφώνουν το πεπρωμένο του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) της α-συνουκλεΐνης. Μελέτες έχουν αναφέρει μεταλλάξεις στο 3' αμετάφραστο άκρο (3'UTR) του mRNA της α-συνουκλεΐνης νΠ και αλλαγές στην κατανομή μήκους του σε ασθενείς με νΠ σε σχέση με υγιή άτομα. Το 3' αμετάφραστο άκρο της α-συνουκλεΐνης μέσα από το μηχανισμό της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης είναι ικανό να παράγει πολλά διαφορετικά μήκη στο τελικό mRNA. Πιο συγκεκριμένα έχουν αναγνωρισθεί 3'UTR με μήκη 290, 480, 560, 1070 και 2520 βάσεων.

Οι πρωτεΐνες δέσμησης RNA (RNA-binding proteins, RBPs) συμβάλουν σε πληθώρα λειτουργιών στον κύκλο ζωής του mRNA, από το μάτισμα και την εναλλακτική πολυαδενυλίωση, στην μεταφορά του mRNA εκτός του πυρήνα και περαιτέρω στην τοποθέτηση στο κύτταρο, την σταθερότητα την δυναμική κοκκίων στρες, ακόμη και τα επίπεδα μετάφρασης. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν χαρτογράφηση των σημείων στον κύκλο ζωής του mRNA της α-συνουκλεΐνης στα οποία ασκείται ρυθμιστικός έλεγχος από δυο τέτοιες πρωτεΐνες, την AUF1 (AU-binding Factor 1) και hnRNPA1 (heterogenous ribonucleoprotein A1).

Η ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη D (HNRNPD), επίσης γνωστή ως παράγοντας δέσμησης AU 1 (AUF1), περιλαμβάνει τέσσερις πρωτεϊνικές ισομορφές (p37, p40, p42 και p45) ικανές να μετακινούνται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Η AUF1 δεσμεύει αλληλουχίες πλούσιες σε U, GU και UG και συμμετέχει σε πολλές διεργασίες όπως η μεταγραφική ενεργοποίηση και η εναλλακτική ωρίμανση και είτε προάγει την αποσύνθεση είτε ενισχύει τη σταθερότητα και τη μετάφραση των mRNA-στόχων με μηχανισμούς που είναι ακόμη ελάχιστα κατανοητοί.

Η πρωτεΐνη AUF1 κατακρημνίστηκε με χρήση βιοτινυλιωμένων τμημάτων του SNCA mRNA (5'UTR, κωδικεύουσα περιοχή, βραχύ 3'UTR, άπω 3'UTR) όπου βρέθηκε προδεδεμένο στα τμήματα 3'UTR και απών από τις άλλες λειτουργικές περιοχές του mRNA. Στην περίπτωση της ανεβασμένης παρουσίας AUF1, βρέθηκε ικανή να μειώσει τα επίπεδα SNCA mRNA αφήνοντας ανεπηρέαστα τα επίπεδα της μακριάς ισομορφής 3'UTR αποτελούμενη από 2520 βάσεις (3'UTR<sub>2520</sub>). Η μείωση των συνολικών επιπέδων συνέπεσε με αποσταθεροποίηση των βραχέων ισομορφών του mRNA και μείωση του μέσου μήκους της πολύ(A) ουράς τους. Το μήκος της πολύ(A) ουράς αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για το χρόνο ζωής ενός μορίου mRNA, με τη βράχυνση της να σηματοδοτεί διαδικασίες καταστροφής του. Περαιτέρω πειράματα κατακρημνίσεως με βιοτινυλιωμένο RNA και συν-ανοσοκατακρημνίσεως έδειξαν πως η AUF1 στρατολογεί το σύμπλοκο αποαδενυλίωσης

CNOT1-CNOT7 στο mRNA της α-συνουκλεΐνης. Τέλος, αποτρέπει την πρόσδεση *SNCA* mRNA – ριβοσώματος, οδηγώντας συνολικά σε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων α-συνουκλεΐνης κατά 35%. Από την άλλη πλευρά, η μείωση των επιπέδων AUF1 επέφερε μείωση των επιπέδων α-συνουκλεΐνης της τάξης του 35%, δεδομένο που ξάφνιασε καθώς ανέβασε τα συνολικά επίπεδα mRNA της α-συνουκλεΐνης, όπως και της ισομορφής 3'UTR<sub>2520</sub>. Όχι μόνον αυτό, αλλά πρόσδωσε σταθερότητα στο βραχύ mRNA της α-συνουκλεΐνης και αύξησε το μέσο μήκος της πολύ(A) ουράς. Πιθανή εξήγηση για την παρακώλυση της πρωτεϊνοσύνθεσης α-συνουκλεΐνης απουσία AUF1 αποτελεί η εντονότατη συγκράτηση τόσο των βραχέων όσο και των επιμηκών ισομορφών mRNA της α-συνουκλεΐνης στον πυρήνα. Δεδομένης της έντονης πυρηνικής παρουσίας της AUF1 φαίνεται σημαντική για την 'υγιή' έξοδο των mRNA της α-συνουκλεΐνης από τον πυρήνα. Τέλος, δεδομένης της βιβλιογραφικά γνωστής αλληλεπίδρασης της AUF1 με τα miRNA ελέγχθηκε η αλληλεπίδραση της AUF1 με τους ισχυρούς αρνητικούς ρυθμιστές του mRNA της α-συνουκλεΐνης miRNA-7 και miRNA-153. Χειραγώγηση των επιπέδων AUF1 άφησε ανεπηρέαστα τα επίπεδα των miRNAs και δεν έδειξε να συμμετέχει σε ανατροφοδοτικό κύκλο με αυτά στην αναστολή της έκφρασης α-συνουκλεΐνης.

Η ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη A1 (hnRNP1) είναι μια εξελικτικά συντηρημένη και υψηλά εκφραζόμενη πρωτεΐνη που εμπλέκεται σε ποικίλα γεγονότα επεξεργασίας RNA, συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφής, της διατήρησης των τελομερών, της ωρίμανσης των miRNA, της σταθερότητας του mRNA και της μετάφρασης. Έχει συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση και η πολυσυστηματική πρωτεϊνοπάθεια.

Ομοίως με την AUF1 η hnRNP1 προσδέεται τόσο στο εγγύς όσο και στο άπω 3'UTR χωρίς να παρουσιάζει συγγένεια με τα 5'UTR και την κωδική περιοχή του *SNCA* mRNA, υποδεικνύοντας πως δύναται να ασκήσει έλεγχο σε όλες τις ισομορφές 3'UTR. Η βιβλιογραφική γνώση πως η hnRNP1 συμμετέχει στην έξοδο ορισμένων mRNA στόχων από τον πυρήνα μας οδήγησε στη διερεύνηση της επιρροής της στην υποκυτταρική τοποθέτηση του mRNA της α-συνουκλεΐνης, όπου και οδήγησε σε παρατεταμένη παραμονή της 3'UTR<sub>2520</sub> ισομορφής στον πυρήνα (με την αποσιώπηση hnRNP1 να οδηγεί σε αυξημένη έξοδο του mRNA από αυτόν). Επιπλέον, σε μοντέλο κατεχολαμινεργικών κυττάρων βρέθηκε ικανό να μεταβάλει την κυτταροπλασματική τοποθέτηση του mRNA ευνοώντας την παραμονή των πιο επιμηκών ισομορφών στο σώμα σε σχέση με την τους νευράξονες, γεγονός που είχε αντίκτυπο και στα επίπεδα πρωτεΐνης. Δεδομένης της τοξικής επίδρασης της υπερβολικής α-συνουκλεΐνης στους νευρώνες, η λειτουργία της hnRNP1 ως ρυθμιστής της τοποθέτησης του mRNA και της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης υποδεικνύει την ενδεχόμενη σημαντικότητά της στον νευροεκφυλισμό διαμεσολαβούμενο από α-συνουκλεΐνη.

Η hnRNP1 φάνηκε ρυθμιστής της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης (ΕΠΑ), με την υπερέκφρασή του να οδηγεί σε αύξηση της αναλογίας της μακριάς ισομορφής δια του συνόλου κατά 45%. Εξετάστηκαν τρεις πιθανοί μηχανισμοί που διέπουν την ΕΠΑ της α-συνουκλεΐνης, η παρεμβολή στους παράγοντες της επεξεργασίας του 3' άκρου, η συνεργασία με το συστατικό του συναρμοσώματος U1 και τέλος η ενίσχυση των παραγόντων επιμήκυνσης της μεταγραφής μέσω της προώθησης της πρόσδεσης του φωσφορυλιωμένης-TEFb στην RNA πολυμεράση II, το ένζυμο που συντελεί τη μεταγραφή (Pol II), μηχανισμός ο οποίος φάνηκε να είναι ο πιο πιθανός. Ο διαφορικός έλεγχος των ισομορφών του mRNA της α-συνουκλεΐνης από την hnRNP1 αναγνωρίζεται και στο επίπεδο σταθερότητας του mRNA με την hnRNP1 να οδηγεί σε αποσταθεροποίηση των βραχέων ισομορφών, με μηχανισμό άγνωστο έως τώρα. Φαίνεται

ανεξάρτητη της ρύθμισης μέσω των miRNA-7 και miRNA-153, πιθανολογείται πως συντελείται με εμπλοκή του συμπλόκου CNOT1-CNOT7 καθώς η hnRNP1 επέφερε αποαδενυλίωση χωρίς όμως να έχει βρεθεί άμεση αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο. Η hnRNP1 έχει αναγνωριστεί ως ρυθμιστής των διαδικασιών αποδόμησης και ανακύκλωσης πρωτεϊνών. Επομένως, μελετήθηκε η επίδραση της στις παραπάνω διαδικασίες στο κυτταρικό μοντέλο νευροβλαστικών κυττάρων SK-N-SH, όπου βρέθηκε να ενισχύει την ενεργότητα του πρωτεασώματος, τον καταβολισμό των ουβικουτινιλιωμένων πρωτεϊνών και να επιδρά θετικά στην αυτοφαγική ροή με την αποσιώπηση της να συνεπάγεται με επιβράδυνση των μηχανισμών πρωτεϊνικής καταστροφής. Η άμεση μείωση της συγγένειας SNCA mRNA - ριβοσώματος εξετάστηκε και φάνηκε πως δεν αποτελεί σημείο ρύθμισης. Άθροισμα των παραπάνω συνισταμένων ήταν η πτώση των πρωτεϊνικών επιπέδων α-συνουκλείνης παρουσία hnRNP1 και αύξησή τους απουσία hnRNP1.

Εν κατακλείδι, η διερεύνηση των μηχανισμών εμπλεκόμενων στον έλεγχο της SNCA μέσα από το 3'UTR της από τις AUF1 / hnRNP1 αποκάλυψε δυο σημαντικούς προμεταφραστικούς ρυθμιστές της και τόνισε την σημασία της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης στην εύρυθμη παραγωγή και παρουσία α-συνουκλείνης. Η χαρτογράφηση των αλληλεπιδράσεων των RBP με τα mRNA στόχους τους είναι σημαντική για την κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τη ρύθμιση μεταγράφων, την ισορροπία υγείας/παθογένειας και κατ' επέκταση προσθέτουν στην ανθρώπινη 'εργαλειοθήκη' για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

## Abstract

Alpha-synuclein (SNCA) has been associated with the central nervous system, is localized mainly in the presynaptic terminals of neurons and is thought to be important for synaptic plasticity, vesicular packaging and trafficking. Although its function has not been fully elucidated, it is thought to regulate the amount of synaptic vesicles that bind to the synapse during neurotransmitter release. Abnormal expression of SNCA is a fundamental feature in several diseases including Parkinson's disease (PD), Lewy body dementia and Multiple system atrophy, with a critical role in the initiation and exacerbation of neurodegeneration. Understanding the mechanisms underlying SNCA expression is essential for the development of potential therapeutic interventions. Research activity to date has focused on the processes of misfolding and protein accumulation with little attention paid to the regulatory networks that shape the fate of the  $\alpha$ -synuclein messenger RNA (mRNA). Studies have reported SNPs in the 3' untranslated region (3'UTR) of  $\alpha$ -synuclein mRNA and changes in its length distribution in PD patients compared to healthy individuals. The 3'UTR of  $\alpha$ -synuclein, through the mechanism of alternative polyadenylation, can produce mRNAs of many different lengths. In particular, 3'UTRs with lengths of 290, 480, 560, 1070 and 2520 nucleotides have been identified.

RNA-binding proteins (RBPs) contribute to a plethora of functions in the mRNA life cycle from splicing and alternative polyadenylation to nucleocytoplasmic shuttling and further to subcellular localization, stability, granule stress dynamics and even translation levels. The aim of this study was to map the points in the life cycle of  $\alpha$ -synuclein mRNA at which regulatory control is exerted by two such proteins, AUF1 (AU-binding Factor 1) and hnRNPA1 (heterogeneous ribonucleoprotein A1).

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (hnRNPD), also known as AU-binding factor 1 (AUF1), comprises four protein isoforms (p37, p40, p42 and p45) capable of moving between the nucleus and the cytoplasm. AUF1 binds U-, GU- and UG-rich sequences and is involved in many processes such as transcriptional activation and alternative splicing and either promotes degradation or enhances the stability and translation of target mRNAs by mechanisms that are yet poorly understood.

AUF1 protein was precipitated using biotinylated SNCA mRNA segments (5'UTR, coding region, proximal 3'UTR, distal 3'UTR) where it was found bound to the 3'UTR segments and absent from the other functional regions of the mRNA. Upregulated AUF1 was able to reduce SNCA mRNA levels leaving the levels of the long 3'UTR isoform consisting of 2520 bases (3'UTR<sub>2520</sub>) unaffected. The decrease in total mRNA levels coincided with destabilization of the short mRNA isoforms and a shortening of their average poly(A) tail length. The length of the poly(A) tail is a determinant of the lifetime of an mRNA molecule, with its shortening signaling destruction processes.

Further biotinylated RNA precipitation and co-immunoprecipitation experiments showed that AUF1 recruits the CNOT1-CNOT7 deadenylation complex to the  $\alpha$ -synuclein mRNA. Finally, it prevents SNCA mRNA-ribosome binding, leading to an overall 35% reduction in  $\alpha$ -synuclein protein levels. On the other hand, reduction of AUF1 levels resulted in a 35% decrease in  $\alpha$ -synuclein levels, a surprising fact as it elevated the total  $\alpha$ -synuclein mRNA levels, as well as the 3'UTR<sub>2520</sub> isoform. Additionally, it increased the stability of the short mRNA of  $\alpha$ -synuclein and increased the average length of the poly(A) tail. A possible explanation for the inhibition of  $\alpha$ -synuclein protein synthesis in the absence of AUF1 is the strong retention of both short and long mRNA isoforms of  $\alpha$ -synuclein in the nucleus. Given the strong nuclear presence of AUF1 it seems important for the 'healthy' exit

of  $\alpha$ -synuclein mRNA from the nucleus. Finally, given the literature-known interaction of AUF1 with miRNAs, the interaction of AUF1 with the strong negative regulators of  $\alpha$ -synuclein mRNA miRNA-7 and miRNA-153 was tested. Manipulation of AUF1 levels left the levels of miRNAs unaffected and did not appear to participate in feedback loops in inhibiting  $\alpha$ -synuclein expression.

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1) is an evolutionarily conserved and highly expressed protein involved in a variety of RNA processing events, including transcription, telomere maintenance, miRNA splicing, mRNA stability and translation. It has been associated with neurodegenerative diseases such as Amyotrophic Lateral Sclerosis and Multisystem proteinopathy.

Similarly to AUF1, hnRNPA1 binds to both the proximal and distal 3'UTR without showing affinity to the 5'UTR and the SNCA mRNA coding region, indicating that it can exert control over all 3'UTR isoforms. The knowledge that hnRNPA1 is involved in the exit of certain target mRNAs from the nucleus led us to investigate its influence on the subcellular localization of  $\alpha$ -synuclein mRNA, where it led to a prolonged persistence of the 3'UTR<sub>2520</sub> isoform in the nucleus (with hnRNPA1 silencing leading to increased mRNA exit from the nucleus). Furthermore, in a catecholaminergic cell model, it was found to be able to alter the cytoplasmic localization of mRNA favoring the persistence of more elongated isoforms in the soma relative to the outgrowth, an observation which was paralleled in protein levels. Given the toxic effect of excessive  $\alpha$ -synuclein on neurons, the function of hnRNPA1 as a regulator of mRNA and  $\alpha$ -synuclein protein localization suggests its potential importance in  $\alpha$ -synuclein-mediated neurodegeneration.

The hnRNPA1 appeared to be a regulator of alternative polyadenylation (APA), with its overexpression leading to a 45% increase in the long isoform-to-total ratio. Three possible mechanisms underlying the APA of  $\alpha$ -synuclein were examined, interference with the 3' end processing factors, cooperation with the U1 spliceosome component and finally enhancement of transcription elongation factors by promoting the binding of phosphorylated-TEFb to RNA polymerase II (Pol II), which seemed to be the most likely mechanism. Differential control of  $\alpha$ -synuclein mRNA isoforms by hnRNPA1 is also identified in the case of mRNA stability with hnRNPA1 leading to destabilization of short isoforms, with a mechanism so far unknown. It appears independent of regulation via miRNA-7 and miRNA-153, presumably occurring with involvement of the CNOT1-CNOT7 complex as hnRNPA1 induced deadenylation but no direct interaction with the complex has been found. hnRNPA1 has been identified as a regulator of protein degradation and recycling processes. Therefore, its effect on these processes was studied in the SK-N-SH neuroblastoma cell model, where it was found to enhance proteasome activity, catabolism of ubiquitinated proteins and positively affect autophagic flux with its silencing being associated with a slowing down of protein degradation mechanisms. The direct reduction of SNCA mRNA-ribosome affinity was examined and shown not to be a point of regulation. The sum of the above components was a decrease in protein  $\alpha$ -synuclein levels in the presence of hnRNPA1 and an increase in the absence of hnRNPA1.

In conclusion, the investigation of the mechanisms involved in the control of SNCA through its 3'UTR by AUF1/hnRNPA1 revealed two important pre-translational regulators of SNCA and highlighted the importance of alternative polyadenylation in the orderly production and presence of  $\alpha$ -synuclein. Mapping the interactions of RBPs with their target mRNAs is important for understanding the mechanisms underlying transcript regulation, health/pathogenesis balance and thus adding to the human 'toolbox' for the development of novel therapeutic approaches.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## Παράρτημα

Πίνακας Σ1. Εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν

Όνομα	Χρήση	Πρόσθιος Εκκινητής	Ανάστροφος εκκινητής
hs_AUF1_CDS	pENTR	GATATGGTACCGCCACCATG TCGGAGGAGCAGTTCGG	GATATGCGGCCGCTGGGGA TAAGTTGCAAATGGAAT
hs_hnRNPA1_CDS	pENTR	GATATGGTACCGCCACCATG TCTAAGTCAGAGTCTCC	GATATGCGGCCGCTGCTAA GCTTTGTTTCCTAATTA
AUF1_shRNA1	Block-iT U6 RNAi	CACCGCCTGAATGGAAGTA TGACGTTCTCGAGAACGTCA TACTTCATTCAAGG	AAAACCTGAATGGAAGTAT GACGTTCTCGAGAACGTCA ACTTCATTCAAGGC
AUF1_shRNA2	Block-iT U6 RNAi	CACCGAGAGTGGTTATGGG AAGGTATCTCGAGATACCTT CCCATAACCACTC	AAAAGAGTGGTTATGGGAA GGTATCTCGAGATACCTTCC CATAACCACTCTC
hnRNPA1_shRNA1	Block-iT U6 RNAi	CACCGCAACAATCAGTCTTC AAATTTCTCGAGAAATTTGA AGACTGATTGTTG	AAAACAACAATCAGTCTTCA AATTTCTCGAGAAATTTGAA GACTGATTGTTGC
hnRNPA1_shRNA2	Block-iT U6 RNAi	CACCGAGATATTTGTTGGTG GCATTACTCGAGTAATGCCA CCAACAAATATC	AAAAGATATTTGTTGGTGGC ATTACTCGAGTAATGCCACC AACAAATATCTC
SNCA_CDS_3UTR371	paavCAG	ATCATTTTGGCAAAGAATTG GATCCACCGCCACCATGGAT GTATTCATGAAAGG	CCAGAGGTTGATTATCGATA AGCTTCTAAAAATCTTATAA TATATGATAGCAAATC
SNCA_CDS_3UTR576	paavCAG	ATCATTTTGGCAAAGAATTG GATCCACCGCCACCATGGAT GTATTCATGAAAGG	CCAGAGGTTGATTATCGATA AGCTTATATTTTTGCAATGA GATAACG
SNCA_CDS_3UTR1080	paavCAG	ATCATTTTGGCAAAGAATTG GATCCACCGCCACCATGGAT GTATTCATGAAAGG	CCAGAGGTTGATTATCGATA AGCTTTTTATTTCATGGTCGA ATATTTATTG
SNCA_CDS_3UTR2529	paavCAG	ATCATTTTGGCAAAGAATTG GATCCACCGCCACCATGGAT GTATTCATGAAAGG	CCAGAGGTTGATTATCGATA AGCTTTATTTTCATATATGTA TATATTTATTATGTAC
T7_hs_SNCA_5UTR	Biotin probe	CCAAGCTTCTAATACGACTC ACTATAGGGAGAGGAGAA GGAGAAGGAGG	AATTCCTTACACCACAC
T7_hs_SNCA_CDS	Biotin probe	CCAAGCTTCTAATACGACTC ACTATAGGGAGAAATGGATG TATTCATGAAAGG	TATTATATGCGGCCGCTTAG GCTTCAGGTTCTGATG
T7_hs_SNCA_3UTR proximal	Biotin probe	CCAAGGTTGTAATACGACTC ACTATAGGGAGAGAAATAT CTTTGCTCCAGT	GGCCCCATGCGGCCGCATA TTTTTGAATGAGATAA
T7_hs_SNCA_3UTR distal	Biotin probe	CCAAGCTTCTAATACGACTC ACTATAGGGAGAGCTTATA AGCAACATGAATTAAGA ACTGA	GCTTCCTGAAAAGGCTTATA TGACTTAA
T7_hs_SNCA_3UTR	Biotin probe	CCAAGGTTGTAATACGACTC ACTATAGGGAGAGAAATAT CTTTGCTCCAGT	GCTTCCTGAAAAGGCTTATA TGACTTAA
ePAT_Anchor	ePAT	-	GCGAGCTCCGCGCCGCGT TTTTTTTTTT



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ePAT_Assay	ePAT	GGTGCTTCCCTTTCCTG	GCGAGCTCCGCGGC
hs_AUF1_total	RT-qPCR	GATCCTAAAAGGGCCAAAG C	GAGAAAGGCCACCAACAAA A
hs_hnRNPA1_total	RT-qPCR	GACCCATGAAGGGAGGAAA	ATAGCCACCTTGGTTTCGTG
hs_SNCA_total	RT-qPCR	GAAATATCTTTGCTCCAGT	ACATTGGAAGTGAAGCACTG
hs_SNCA_long	RT-qPCR	TGACGGTAATTTTTGAGCAG TGAA	GCTTCTGAAAAGGCTTATA TGACTTAA
hs_SNCA_intron_4	RT-qPCR	TGGCTTGAGGGTCATAGCTT	GAGGCAGAATAGGTGGGAC A
hs_SNCA_exon_4-6	RT-qPCR	GGCTTTGTCAAAAAGGACC A	ACATTGGAAGTGAAGCACTG
hs_SNCA_intron5-exon6	RT-qPCR	TTAGTGTAAGTGGGGAGCC A	CTCAAGAACTGGGAGCAA AGA
hs_SNCA_intron3-exon4	RT-qPCR	ACAGGTGTATGGAAGCCGA T	ACCACTGCTCCTCCAACATT
hs_GAPDH	RT-qPCR	GCACCACCAACTGCTTAG	GCCATCCACAGTCTTCTG
hs_ACTB	RT-qPCR	GTGGCCGAGGACTTTGATT G	CCTGTAACAACGCATCTCAT ATT
hs_U6	RT-qPCR	TTCACGAATTTGCGTGTCAT	CGCTTCGGCAGCACATATAC
hsa-miR-7-5p	RT-qPCR	CGCAGTGAAGACTAGTGA	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTT ACAACA
hsa-miR-153-3p	RT-qPCR	GCAGTTGCATAGTCACAAAA G	AGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTT TTGAT
hsa-miR-191-5p	RT-qPCR	GCAACGGAATCCCAAAG	CCAGTTTTTTTTTTTTTTTCA GCTG



